Über die
Wiedergewinnung der Saponine aus dem Blute.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt

vom

prakt. Arzt **Baltes**
zur Zeit Unterarzt in **Langfuhr.**

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Rostock.
Rats- und Universitäts-Buchdruckerei von Adlers Erben, G. m. b. H.
1914.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät zu Rostock.

Referent: R. Kobert.

Meinen Eltern

in Liebe zugedacht.

Inhalts-Verzeichnis.

Seite

I. Was wissen wir über die Bindung und Entgiftung der Saponine im Blute? 5
1. Verhalten der Saponine zum Blutplasma bezw. Blutserum 5
2. Verhalten der Saponine zu den roten Blutkörperchen . . 12
3. Verhalten der Saponine zu den weißen Blutkörperchen . 16
II. Wiedergewinnung von Quillajasaponinen 16
III. „ „ Sapindussaponin 36
IV. „ „ Saponalbin 42
V. „ „ einigen andern Saponinen
1. von neutralem Herniariasaponin 45
2. „ Agrostemmasapotoxin 46
3. „ Assamin 47
4. „ Digitonin 47
5. „ Cyclamin 48
6. „ neutralem Guajakrindensaponin 49

I Was wissen wir über die Bindung und Entgiftung der Saponine im Blute?

Die in der Überschrift aufgeworfene Frage muß für den zelligen und den flüssigen Teil des Blutes gesondert besprochen werden.

1. Verhalten der Saponine zum Blutplasma bezw. Blutserum.

Da zwischen Plasma und Serum betreffs des Verhaltens zu den Saponinen kein wesentlicher Unterschied ist, wollen wir uns hier mit dem Besprechen des Verhaltens hauptsächlich zum Serum begnügen, da die Mehrzahl der hier zu besprechenden Versuche nur an Serum ausgeführt worden sind.

Nachdem E. Hédon[1]) darauf hingewiesen hatte, daß man eine größere Menge eines Saponins zu im Blutplasma suspendierten roten Blutkörperchen als zu in einem gleichen Volumen 0,9%iger Kochsalzlösung suspendierten zusetzen muß, um Hämolyse hervorzurufen, und diese Tatsache so gedeutet hatte, daß das Blutplasma gewisse Schutzstoffe enthält, welche die Wirkung der Saponine auf die roten Blutkörperchen herabsetzen, hat Ransom[2]) gezeigt, daß es das im Blutplasma bzw. -serum enthaltene Cholesterin ist, welches diese Schutzwirkung ausübt. Digerierte er vorher in der Wärme die

[1]) Hédon, sur l'action globulicide des glycosides et les conditions de milieu qui favorisent ou l'empèchent. Compt. rend. de la soc. de Biologie 1900, S. 771.

[2]) F. Ransom, Deutsche med. Wchschr. 1901, S. 194.

Saponinlösungen, die er aus einem von E. Merck bezogenen Handelspräparate dargestellt hatte, mit Cholesterin, so ging deren Giftigkeit auf Null herunter. Kobert[1]) und zahlreiche andere Autoren haben die Entgiftung auch verschiedener anderer Saponine durch Cholesterin bestätigt. Hausmann[2]), sowie Abderhalden und Le Count[3]) und in unserm Institute Halberkann[4]) haben gezeigt, daß die Phytosterine ebenfalls entgiftend wirken. Windaus[5]) hat die Entdeckung Ransoms auf chemische Basis gestellt, denn es gelang ihm zu zeigen, daß tierische und pflanzliche Cholesterinsubstanzen sich mit gewissen Saponinen zu kristallinischen Komplexverbindungen, Saponincholesteride genannt, verbinden, in denen die beiden Komponenten in äquimolekularen Mengen enthalten sind. Für die chemische Bindung des Cholesterins und der Phytosterine an die Saponine ist nach Versuchen von Hausmann[6]) einerseits und von Abderhalden und Le Count[7]) andererseits die Hydroxylgruppe und das Bestehen einer doppelten Bindung von Bedeutung. Alle Derivate, in denen die freie Hydroxylgruppe fehlt, besitzen keine Spur von antihämolytischer Wirkung. Abderhalden und Le Count deuten an, daß die Wirkung der Sterine, vielleicht rein physikalisch zu erklären sei. Kobert nimmt an, daß dies nur für die erste Phase des Verankerungs-

---

[1]) R. Kobert, Beitr. z. Kenntnis der Saponinsubstanzen (Stuttgart 1904), S. 49.

[2]) W. Hausmann, Hofmeisters Beiträge Bd. **6**, 1905, S. 567.

[3]) Abderhalden und Le Count, Ztschr. f. exp. Path. u. Ther. Bd. **2**, S. 199.

[4]) Jos. Halberkann, über Assamin, das neutrale Saponin der Assamteesamen. Biochem. Ztschr. Bd. **19**, 1909, S. 44.

[5]) A. Windaus Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. Jg. **42**, 1909, S. 238.

[6]) W. Hausmann, Hofmeisters Beiträge Bd. **6**, 1905, S. 567.

[7]) Abderhalden und Le Count, Ztschr. f. exp. Path. u. Ther. Bd. **2**, 1905, S. 199.

prozesses Geltung haben könne. Den Anschauungen von Abderhalden und Le Count tritt Zangger[1]) in gewisser Hinsicht bei; nach ihm führen die Saponine die Hämolyse lediglich dadurch herbei, daß sie negative Kolloide sind. Die Verankerungsprodukte — um einmal im Sinne Ehrlichs zu reden — der Sterine mit den Saponinen sind, soweit Windaus sie chemisch rein darstellte, in Wasser unlöslich und praktisch so gut wie ungiftig. Rein theoretisch betrachtet sind sie nach Madsen und Noguchi[2]) dissociabel und nicht in jeder Menge ungiftig.

Hier müssen wir fragen, wieviel solches entgiftend wirkendes Cholesterin das Blutserum enthält, und in welcher Form dies vorhanden ist. Wir unterscheiden ja jetzt im Blute und in den Organen eigentliches Cholesterin im engeren Sinne, ferner Oxycholesterin und endlich Cholesterinester. Von den Cholesterinen im engeren Sinne muß man nach Windaus und Uibrig[3]) zwei Reihen unterscheiden. Die erste Reihe besteht aus ungesättigten sekundären Alkoholen von der Formel $C_{27}H_{46}O$; hierher gehört das gewöhnliche Cholesterin der Galle, das Sitosterin der Weizenkeimlinge etc. Die zweite Reihe besteht aus gesättigten sekundären Alkoholen von der Formel $C_{27}H_{48}O$; hierher gehört das als Dihydrocholesterin (auch β-Cholestanol genannt) zu deutende Koprosterin der Fäces und wahrscheinlich das Isocholesterin der Schafwolle. Nicht nur die echten Cholesterine und Phytosterine, sondern auch die Ochycholesterine verbinden sich nach Lifschütz[4]) mit Saponinen und zwar nament-

---

[1]) H. Zangger, Compt. rend. de la soc. de Biol. **58**, 1905, S. 589 u. **59**, 1905, S. 664.

[2]) Th. Madsen und H. Noguchi, Bull. de l'Acad. des sc. et des lettres de Danemark, Jg. 1904, S. 457 u. 1905, S. 1.

[3]) A. Windaus und C. Uibrig, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. Jg. **47**, 1914, S. 2384.

[4]) J. Lifschütz, Deutsche med. Wochenschrift. 1913, S. 2313.

lich mit dem als Reagens auf Cholesterine jetzt so viel benutzten Digitonin, während die Cholesterinester auf Saponine keine Einwirkung haben. Nun erst können wir zur Besprechung der Menge der Cholesterinsubstanzen des Blutes bezw. Serums übergehen.

Nach Grigaut und l'Huillier ist zwischen dem Gehalt des Gesamtblutes und des Serums kein rechter Unterschied. In 100 cm^3 Gesamtblut gesunder Menschen fanden diese Autoren 150—160 mg Cholesterin und in 100 g Serum Gesunder 168—175 mg. Die Zahlen für Plasma sind mit denen des Serums identisch. Weiter fanden diese Autoren, daß vom Cholesterin des Serums nur ein Teil freies ist; das übrige ist als Ester vorhanden und kommt für die Saponinentgiftung nicht in Frage. Reichliche Ernährung und Gravidität steigert den Cholesteringehalt des Serums. Autenrieth und Funk[1]) fanden in 100 cm^3 normalen Menschenblutes 140—160 mg Cholesterin. Genau dieselben Werte will P. Obakewitsch[2]) gefunden haben. Klinkert[3]) fand in 100 ccm Serum des normalen Menschenblutes nach der Methode von Chaffard und Grigaut 176 mg Cholesterin und nach der Digitoninmethode von Windaus 182 mg. Klinkert bestätigt, daß der Cholesteringehalt des Serums bei Schwangeren erhöht ist und bei Neugeborenen sehr gering ist. Gerade deshalb wird in unserem Institute zu Saponinversuchen das Blut Neugeborener stark bevorzugt.

Nach Siegmund Fränkel[4]) ist bei Schwangern übrigens nur der Gehalt an Cholesterinestern vermehrt, nicht aber der an freiem Cholesterin. Joh. Müller[5]) fand

---

[1]) Autenrieth und Funk, Münch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 23, S. 1243.

[2]) P. Obakewitsch, Rußki Wratsch 1913, Nr. 31—32.

[3]) D. Klinkert, Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 18, S. 820.

[4]) Sigmund Fränkel, Wiener med. Wchschr. 1913, Nr. 36, S. 2197.

[5]) Joh. Müller, Ztschr. f. physiol. chem. Bd. 86, 1913, S. 482.

bei sieben teils gesunden teils kranken Personen pro 100 g Serum, 106—350 mg Cholesterin. Diese Zahlen dürften für das Menschenserum genügen. Für Kaninchenserum fanden Ellis und Gardner[1]) in 100 g 60—80 mg freies Cholesterin. Wacker und Hueck[2]) haben das Verdienst, sowohl das freie als das gebundene Cholesterin im Serum und im Gesamtblut mehrerer Tierarten bestimmt zu haben. Sie fanden

pro	100 g	Serum	des	Kaninchens	53 mg	Gesamtcholesterin	(20 mg)
„	„	„	„	Hundes	128 mg	„	(36 mg)
„	„	„	„	Kalbes	95 mg	„	(25 mg)
„	„	„	„	Pferdes	82 mg	„	(18 mg).

Die eingeklammerten Zahlen bezeichnen den Wert für freies Cholesterin. Sie zeigen, daß die Zahlen von Ellis und Gardner für das Cholesterin des Kaninchenserums wohl zu hoch sind. Was die künstliche Vermehrung des Cholesterins durch reichliche Zufuhr mit der Nahrung anlangt, fanden Mary Fraser und Gardner[3]), daß Kaninchen vom verfütterten Cholesterin einen Teil unverändert mit dem Kote ausscheiden und nur den Rest resorbieren; dieser kann dann im Blute als freies Cholesterin gefunden werden. In Esterform gereichtes Cholesterin wurde hydrolysiert und fand sich im Blute als freies wieder. Phytosterin verhielt sich ganz analog dem Cholesterin. Die Frage, ob verfütterte oder eingespritzte Phytosterine im Blute der Tiere als Phytosterin viel vorhanden sind oder vorher in echtes animalisches Cholesterin umgewandelt werden, scheint bisher noch von niemand genauer untersucht worden zu sein. Wacker und Hueck[4]) konnten

---

[1]) Ellis und Gardner, zitiert bei Riesenfeld und Lummerzheim, Ztschr. f. pysiol. chem. Bd. 87, 1913, S. 270.

[2]) Wacker und Hueck, Arch. exp. Path. u. Pharm., Bd. 74, 1913, S. 422.

[3]) Mary T. Fraser und J. A. Gardner, Proc of the Royal Soc. Serie B., Vol. 81, 1909, S. 129 und 230.

[4]) Wacker und Hueck f. c. S. 439.

durch Verfüttern von freiem Cholesterin an Katzen, Hunden und Kaninchen den Cholesteringehalt des Serums dieser Tiere erheblich steigern und zwar den an Cholesterinestern sogar bis auf das zweiundzwanzigfache des Normalen. Auch nach subkutaner Einspritzung von freiem Cholesterin sowie von Ölsaurecholesterinester fand im Blutserum eine Steigerung des freien und des gebundenen Cholesterins statt.

Kommen wir auf die uns hier angehende Frage zurück, ob der Cholesteringehalt von 5—10 cm^3 des zu hämolytischen Versuchen ja meist 50—100 fach verdünnten Blutes groß genug ist, um eine wesentliche Differenz gegenüber einer ebenso verdünnten Suspension der Blutkörperchen dieser Blutart in physiologischer Kochsalzlösung zu ergeben, so erscheint dies sehr unwahrscheinlich. Bei der in unserem Institute üblichen Versuchsanordnung, wo 5—10 ccm der 50—100fach verdünnten Blutsorten in jedem Versuchsgläschen enthalten sind, würde es sich, da nur freies Cholesterin in Frage kommt, nach Wacker und Hueck nämlich nur um höchstens 0,036—0,072 Milligramm Cholesterin bei den üblichen Tierblutarten und bei Placentarblut um noch weniger handeln. Es ist äußerst unwahrscheinlich, daß so kleine Cholesterinmengen so große Differenzen bedingen können, wie sie zwischen Blut und gewaschenen Blutkörperchen bei manchen Saponinen gefunden worden sind.

K. Meyer[1]) stellte daraufhin eingehende Versuche an, welche andere Substanzen des Blutserums die Schutzkraft des Cholesterins zu vermehren imstande sind. Naturgemäß möchte man die Kolloidnatur der Eiweißstoffe dafür verantwortlich machen; indessen Eieralbumin, Kasein, Edestin und Gelatine zeigten gar keine Schutz-

[1]) Kurt Meyer, Arch. f. Hygiene. Bd. **65**, 1908, S. 292.

wirkung. Es müssen, so schließt Meyer, ganz spezifische, nur den Serumeiweißkörpern zukommende Eigenschaften sein, die den Saponinen gegenüber antihämolytisch wirken. Riesenfeld und Lummerzheim[1]) kommen ebenfalls bei einer Untersuchung über das Verhalten des Cyclamins zu Blut zu dem Ergebnis, daß die antihämolytische Fähigkeit des normalen Serums gegenüber dem Cyclamin garnicht auf die des Cholesterins oder wenigstens nicht auf diese allein sondern in erster Linie auf die eines anderen Stoffes zurückzuführen ist. Dazu stimmt, daß nach E. Oppenheimer[2]) auch einigen den Saponinen pharmakologisch verwandten Stoffen, wie dem Digitoxin, Digitalin, Gitalin und Oleandrin gegenüber Blutserum ungleich stärker entgiftend wirkt als Cholesterin.

Alles bisher Gesagte gilt für nicht koaguliertes Blutserum. Wenn wir aber zu analytischen Zwecken Blutserum oder Vollblut durch Eingießen in kochendes Wasser oder durch Zusatz angesäuerter konzentrierter Lösungen von Neutralsalzen koagulieren, um im Filtrat Alkaloide, Glykoside, Toxine oder sonstige wasserlösliche Giftstoffe nachzuweisen, kommt hier ein wichtiger weiterer Faktor in Betracht, nämlich, daß die Bluteiweiße als Schutzkolloide die Saponine durch Adsorption an sich reißen und quantitativ mit niederschlagen. Ich verweise betreffs aller Einzelheiten über diesen speziellen Fall der Einwirkung eines Kolloides auf das andere auf die sehr überzeugenden Ausführungen von Wilh. Biltz[3]).

---

[1]) E. H. Riesenfeld und H. Lummerzheim, Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. **87**, 1913, S. 270.

[2]) Ernst Oppenheimer, Biochem. Ztschr. Bd. **55**, 1913, S. 134.

[3]) Wilh. Biltz, Über die gegenseitige Beeinflussung kolloidal gelöster Stoffe. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. Jg. **37**, 1904, S. 1095.

Wir werden also bei Versuchen, das Saponin aus hämolysiertem Blute wiederzugewinnen, darauf Rücksicht nehmen müssen, daß es nur teilweise an Cholesterin, teilweise aber auch an andere Stoffe des Serums, wahrscheinlich an sämtliche Eiweißstoffe teils physikalisch, teils chemisch gebunden ist.

2. Verhalten der Saponine zu den roten Blutkörperchen.

Wie Kobert[1]) fand, und wie seitdem von den verschiedensten Seiten bestätigt worden ist, werden die roten Blutkörperchen aller Wirbeltiere und einiger Wirbellosen durch die meisten Saponinsubstanzen zur Ausstoßung ihres gefärbten Inhaltes gebracht. Die Stromata bleiben, wie Kobert bald darauf durch Tufanow[2]) nachweisen lassen konnte, erhalten. Itami und Pratt[3]) zeigten, daß es zur quantitativen Gewinnung der Stromata kein besseres Mittel gibt als die Saponinhämolyse. In der oben erwähnten Arbeit über die Schutzkraft des Serums gegen die Hämolyse schließt sich Ransom, eng an eine von Overton aufgestellte Hypothese an, nach der die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der lebenden pflanzlichen und tierischen Zellen durch die Imprägnation der Grenzschichten des Protoplasmas mit Cholesterin, Lecithin und mit anderen diesen Stoffen in ihren Lösungsvermögen ähnlichen Verbindungen bedingt werden. Ransom stellt daraufhin den Satz auf, daß die durch Saponin veranlaßte Hämolyse auf Verbindung der Saponine mit dem Cholesterin der roten Blutkörperchen be-

[1]) R. Kobert, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **23**, 1887, S. 259.

[2]) Nik. Tufanow, Arb. des pharmakol. Instituts zu Dorpat, hsgb. von R. Kobert, **1**, 1888, S. 124.

[3]) S. Itami und J. Pratt, Biochem. Zeitschrift **18**, 1907, S. 312.

ruht. Arrhenius[1]) hat dann den Vorgang der Aufnahme der Saponine durch die roten Blutkörperchen quantitativ für ein Saponin verfolgt und gezeigt, daß, wenn Blutkörperchen in einer Lösung dieses Saponins in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert werden, sie solange Saponin aus dieser aufnehmen, bis die mittlere Konzentration des Saponins in den Blutkörperchen circa 120 mal größer ist als die Konzentration in der umgebenden Flüssigkeit. Diese Speicherung wird von den die Außenschicht der Blutkörperchen bildenden Lipoiden besorgt. Somit hat es für uns ein Interesse, zu erfahren, wie groß der Cholesteringehalt der roten Blutkörperchen ist. Nach Wacker und Hueck[2]) enthalten 100 g feuchte rote Blutkörperchen beim Kaninchen 154 mg freies Cholesterin, beim Hund 185 mg, beim Kalb 199 mg und beim Pferd 162 mg. Für die des gesunden Menschen fanden Grigaut und l'Huillier 130—170 mg. Der Gehalt der roten Blutkörperchen an Cholesterinestern ist fast Null. Eine sehr interessante Beziehung des Serumcholesterins zu dem Blutkörperchencholesterin bei gesunden und kranken Menschen hat Joh. Müller[3]) herausgefunden. Er konnte nämlich dartun, daß der Cholesteringehalt der Blutkörperchen umgekehrt proportional den entsprechenden Werten des Serums ist. Die Resistenzgröße der gewaschenen roten Blutkörperchen gegen ein und dasselbe Saponin stellt, bezogen auf das einzelne Blutkörperchen, bei verschiedenen Krankheiten nach Heuberger und Stepp[4]) einen ziemlich konstanten Wert dar.

---

[1]) Arrhenius, Meddelanden från K. Vetenskapsakad Nobelinstitut Bd. **1**, 1909, Nr. 10.

[2]) Wacker u. Hueck, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **74**. 1903, S. 422.

[3]) Joh. Müller, Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. **86**, 1913, S. 482.

[4]) Heuberger u. W. Stepp, Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **106**, 1912, H. 5—6.

Nach Pascucci[1]) bestehen die Stromata der roten Blutkörperchen außer aus Cholesterin hauptsächlich aus Lecithin und diese letztere Substanz darf bei der Erklärung der Saponinwirkung auf die Blutkörperchen nicht unberücksichtigt gelassen werden. Pascucci konnte durch Verschließen von Glasröhren sowie durch Imprägnieren von feiner Seidengaze mit einem Gemisch von Cholesterin und Lecithin gewissermaßen künstliche Blutkörperchen machen und diese mit gelöstem Hämoglobin füllen. Eintauchen in Saponin, Tetanolysin und Kobragift macht diese Membranen undicht. Pascucci schließt, daß für die Saponinhämolyse der roten Blutkörperchen auch das Lecithin von erheblicher Bedeutung ist. Daß die Saponine mit den Lecithinen Verbindungen eingehen, hatte Kobert[2]) schon mehrere Jahre vorher gefunden. Porges und Neubauer[3]) haben diese Saponinlecithide eingehend untersucht und nachgewiesen, daß sie exquisite Kolloidverbindungen sind. Während die Bildung von Saponincholesteriden auf die Saponine entgiftend wirkt, hat nach Kobert[4]) die Bindung der Saponine an Lecithin keine entgiftende Wirkung. K. Meyer[5]) bestätigt die Angabe von Kobert sowie von Porges und Neubauer, daß die Saponine sich mit Lecithin chemisch verbinden und bekämpft die Ansicht von Ransom, nach der die Hämolyse der roten Blutkörperchen durch Bildung von Saponincholesterid

[1]) Olinto Pascucci, Hofmeisters Beiträge Bd. 6, 1905, S. 543.

[2]) R. Kobert, Beitr. zur Kenntnis der Saponinsubstanzen (Stuttgart 1904), S. 50.

[3]) O. Porges u. E. Neubauer, Biochem. Ztschr. Bd. **7**, 1908, S. 172.

[4]) R. Kobert l. c.

[5]) Kurt Meyer, Über den Mechanismus der Saponinhämolyse. Hofmeisters Beitr. Bd. **11**, 1908, S. 357.

zustande komme; sie komme vielmehr durch Bildung von Saponinlecithid zustande. Kobert ist der Meinung, daß bei der Hämolyse serumfreier roter Blutkörperchen durch Saponine sowohl Saponincholesterid als Saponinlecithid sich gleichzeitig bildet. Die weiteren physikalischen Vorgänge in den Blutkörperchen mit derartig veränderter Außenschicht führen, wie Raymond Foß Bacon und Harry F. Marshall[1]) es ausdrücken, zu einem Strom aus dem Binnenraum der Körperchen nach außen, der so heftig ist, daß die Peripherie dabei gesprengt wird. Nach dem blitzartig schnellen Austritt des Hämoglobins schließt sich das Loch wieder. Daß bei der Hämolyse der roten Blutkörperchen durch die den Saponinen nach Scheven[2]) außerordentlich nahestehenden gallensauren Salze sich ebenfalls eine Lecithidverbindung bildet, ja daß diese das für die Hämolyse Ausschlaggebende ist, hat Bayer[3]) dargetan. Um so unverständlicher ist es, daß Overton[4]) gegen die von Kobert aufgestellte Lehre, daß die Saponine sich auch mit Lecithin verbinden können, energisch zu Felde zieht. Koberts Satz dürfte im Gegenteil dahin zu erweitern sein, daß die Saponine wohl mit vielen Phosphatiden Verbindungen eingehen können. Bei den unten folgenden Versuchen die Saponine aus hämolysiertem Blute abzuscheiden, muß jedenfalls auch die Bindung an Lecithin mit berücksichtigt werden.

---

[1]) Raymond Foß Bacon und Harry F. Marshall, The Philippine Journal of Science vol. **1**, 1906, S. 1037.

[2]) Scheven, noch nicht erschienen.

[3]) Gust, Bayer, Untersuchungen über die Gallenhämolyse. Biochem. Ztschr. Bd. **9**, 1908, S. 58.

[4]) E. Overton, Lunds Univ. Årsskrift. [NF.] Afd. 2, Bd. **9**, Nr. 7, 1913.

3. Verhalten der Saponine zu den weißen Blutkörperchen.

Erst durch Wacker und Hueck[1]) sind einwandfreie Analysen des Cholesteringehaltes der Leukocyten geliefert worden. Diese Autoren kamen zu dem überraschenden Ergebnis, daß die Pferdeblutleukocyten fünfmal mehr Cholesterin enthalten als die roten Blutkörperchen, und zwar ist dieses Cholesterin fast ausschließlich freies. Daraus ergibt sich, daß für die Saponinbindung im Blute die Leukocyten eine sehr große Rolle spielen. Eine Auflösung der Leukocyten durch Saponine braucht beim Mischen von Blut und Saponinen im Reagenzglas nicht einzutreten. Bei subakuter und noch mehr bei chronischer Vergiftung von Kaninchen fanden Isaac und Moeckel[2]) keine Leukocytenabnahme, ja bei entmilzten Tieren eine beträchtliche Vermehrung. Die auf Lymphocyten fallende Quote der Leukocyten war stets erhöht. Die Myelocyten fanden sich nur bei einzelnen Tieren vermehrt. Eine stets in großer Menge vorhandene Sorte der Leukocyten nennen Isaac und Moeckel Lymphoidzellen. Es sind große mononukläre Zellen mit meist stark basophilem Protoplasma und großem, oft bizarr gestaltetem Kern.

II. Wiedergewinnung von entgifteten Quillajasaponinen.

Ich benutzte zu den nachfolgenden Versuchen ein Gemisch von Quillajasäure und Quillajasapotoxin, welches ich durch Umreinigen aus Stha-

[1]) Wacker und Hueck, l. c. S. 424.

[2]) S. Isaac und Moeckel, Ztschr. f. klin. Med. Bd. 72, 1911, Heft 3—4.

merschem Handelssaponin gewann. Letzteres war ein weißgraues Pulver, von dem 72% aus den beiden Saponinsubstanzen bestanden. Ich verwandte eine auf reine Saponine berechnete neutrale Lösung in physiol. Kochsalzlösung, aus der auch beim Ansäuern nichts ausfiel. Da nach Kobert[1]) die letale Dose bei intravenöser Einspritzung für Quillajasäure 1 mg pro kg Tier und nach Pachorukow[2]) die letale Dose für Quillajasapotoxin bei gleicher Applikationsart 0,5 mg. beträgt, mußte von diesem Präparate für Kaninchen von cirka 1500 g 1,5 mg von der lugularvene aus letal wirken. In der Tat war dies gleich beim ersten Tiere der Fall. Ebenso wirkte die Lösung noch bei mehr als 10000facher Verdünnung auf 1%ige Blutkochsalzsuspension von Menschen- und Kaninchenblut ausnahmslos total hämolytisch. Sättigte ich nun die Lösung durch längeres Kochen mit äußerst fein zerriebenem Cholesterin, so konnte ich einem mittleren Kaninchen 9 mg und einem anderen 10 mg intravenös in die Obervene langsam applizieren, ohne irgend welche Vergiftungserscheinungen zu erzielen. Damit ist also dargetan, daß das Ransomsche Entgiftungsgesetz auch für die beiden Quillajasaponine gilt. Die Zerlegung des zur Trockne eingedampften Cholesterids gelang mir sowohl durch energische Aetherbehandlung als auch durch die von Madsen und Noguchi[3]), bevorzugte Digestion mit warmem Chloroform. Durch beide Substanzen ließ sich allmählich die Gesamtmenge des gebundenen Cholesterins wieder frei machen und das übrigbleibende Saponin löste sich nun wieder leicht in Kochsalzlösung,

---

[1]) R. Kobert, Über Quillajasäure. Arch. exp. Path. und Pharm. Bd. **23**, 1887, S. 233.

[2]) Dmitrij Pachorukow, Über Sapotoxin. Arb. des pharmakol. Instit. zu Dorpat, hsgb. von R. Kobert **1**, 1888, S. 1.

[3]) Th. Madsen und H. Noguchi, Toxine und Antitoxine; Saponin-Cholesterin. Bullet de l'Acad. des Sc. et des Lettres de Danemark 1904, S. 457.

während die Lösung des Cholesterids in Wasser, wofern es erst einmal zur Trockne eingedampft war, nicht gelingen wollte. Auch in Alkohol erwies sich das trockne Cholesterid als unlöslich.

Ich beabsichtige nun folgendes Verfahren bei den Blutversuchen anzuwenden. Ein Quantum defibriniertes frisches Blut wird mit 1%iger Lösung der Saponine in physiol. Kochsalzlösung langsam und unter Umrühren versetzt, bis alle Blutkörperchen hämolysiert sind. Jetzt ist anzunehmen, daß sich reichlich Cholesteride und Lecithide der Saponine gebildet haben. Es ist ferner auch anzunehmen, daß sich Eiweißverbindungen der Saponine gebildet haben. Schon Pachorukow hatte angegeben, daß die Quillajasäure unter Umständen Eiweiß niederreißt. Émile Perrot[1]) hat diese Wirkung näher untersucht und gefunden, daß sich z. B. aus Hühnereiereiweiß und Quillajasäure in der Tat sehr leicht unlösliche Albuminate bilden, denen man die Quillajasäure durch Alkohol nicht entziehen kann. Weiter darf nicht unerwähnt bleiben, daß nach Kobert[2]) Quillajasäure sich durch gewisse konzentrierte Salzlösungen aussalzen läßt. Setzt man nun zu Blut zum Zweck der Eiweißfällung reichlich Salze, so dürfte die Ausfällung der Quillajasäure teils an sich, teils als Albuminat begünstigt werden. Trotzdem ist anzunehmen, daß bei reichlichem Saponingehalt des Blutes ein Teil ungebunden und ungefällt bleibt. In diesem Falle gilt es, das ungebundene Saponin in Lösung zu behalten, das gebundene aber niederzuschlagen. Dies könnte durch Fällung der Eiweißstoffe teils in der Kälte, teils unter Erhitzen mittelst verd. Säure (mit oder ohne Zusatz einer stärkeren Kochsalzlösung) erzielt werden.

[1]) Émile Perrot et Alb. Goris. Travaux du Laboratoire de Matière médicale de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Paris, Tome 7, 1910 (Paris 1911).

[2]) Kobert, Beiträge zur Kenntnisse der Saponinsubstanzen. (Stuttgart 1904), S. 23.

Es war anzunehmen, daß die Cholesteride und Lecithide dabei mit niedergerissen werden würden, während das überschüssige Saponin durch Waschen des Niederschlages auf dem Filter entfernt werden dürfte. Eine andere Möglichkeit schien darin zu bestehen, das hämolysierte Blut mit Alkohol zu versetzen, wobei ebenfalls zu erwarten war, daß die freien Saponine ins Filtrat gehen, die gebundenen aber im Niederschlag bleiben würden. In beiden Fällen beabsichtigte ich in den gewaschenen Niederschlägen das gebundene Saponin wieder frei zu machen. Dazu gedachte ich nach einander drei Wege einzuschlagen.

Der erste Weg ist der von Liebermann Vater und Sohn[1]) vorgeschlagene. Diese beiden Forscher schlagen vor, nach eingetretener Hämolyse zu zentrifugieren, wobei die Stromata, welche ja die Träger der Cholesteride und Lecithide sind, abgetrennt werden. Sie werden mehrmals auf der Zentrifuge gewaschen und dann mit spurweise angesäuerter Kochsalzlösung extrahiert, wobei die Gesamtmenge der Saponine wieder frei werden soll. In unserm Institute ist dieser Versuch mit Agglutininen zahllose Male mit bestem Erfolg ausgeführt worden; für Hämolysine ist er aber immer mißlungen, und deshalb brachte ich dieser Methode kein großes Vertrauen entgegen. Ich habe aber, wie sich unten zeigen wird, trotzdem ein saures Ausziehen der auf gebundene Saponine zu prüfenden Niederschläge sehr oft vorgenommen.

Der zweite Weg ist der von meinem Kommilitonen Schreuder[2]) benutzte. Schreuder setzte verschiedene Saponine zu einem blutfreien Brei von Organzellen (Gehirn, Leber, Niere, Darmschleimhaut etc.) und suchte dann die Saponine wieder abzutrennen. Da

[1]) L. von Liebermann, Archiv f. Hygiene. Bd. **62**, 1908, S. 299.

[2]) Albert Schreuder, Ueber das Verhalten einiger neutraler Saponinsubstanzen zu isolierten Körperzellen. Dissert. Rostock 1914.

z. B. die Trockensubstanz des Gehirns Erwachsener nach Mensfeld und Liptak zu weit mehr als 50 % aus Lipoiden besteht und auch die der Leberzellen etc. zum mindesten nicht lipoidarm ist, war zu erwarten, daß die Schreuderschen Zellbreimassen sich den Saponinen gegenüber wie Blut verhalten würden. Es gelang nun Schreuder auch nicht in einem einzigen Versuche, die verankerten neutralen Saponine aus dem Zellbrei nach der Methode der beiden Liebermann wiederzugewinnen, wohl aber bei nachheriger Extraktion der Zellen mit verdünnten Alkalien und deshalb beabsichtigte ich, ebenfalls diese Isolierungsmethode zu versuchen. Natürlich war ich mir von vornherein darüber klar, daß ich etwas gelöstes alkalisches Hämatin dabei meist mit in Lösung bekommen würde. Dieses hoffte ich jedoch nachträglich durch Neutralisieren wieder abscheiden zu können.

Der dritte Weg endlich, der möglich sein mußte, ist der der Extraktion der getrockneten Massen nach Madsen und Noguchi mit Chloroform oder Aether in solchen Mengen, daß dadurch die gebundenen Saponine dissociiert werden und ihre Lipoidkomponente an das Lösungsmittel abgeben.

Nach diesen Vorbemerkungen dürften die nachstehenden Versuche mit Quillajasaponine ohne weiteres verständlich sein.

Fibrinfreies Katzenblut, Quillajasaponin der Firma Sthamer, 1 % in Na Cl gelöst.

In zwei Reagenzgläschen werden zwei ganz gleiche Proben angesetzt, und zwar je 10 ccm Katzenblut und 5 ccm Quillajasaponinlösung, enthaltend im ganzen 36 mg der beiden reinen Saponine. Es erfolgte im ersten Augenblicke zwar noch nichts, aber dann tritt langsam totale Hämolyse ein, d. h. der Blutfarbstoff scheidet aus den Blutkörperchen aus, die als weiße Schatten (Stromata) in der dicken roten Flüssigkeit suspendiert und kaum sichtbar sind, wenn man mikroskopisch nach ihnen sucht: makroskopisch sind sie ganz unsichtbar. Es werden zu beiden Proben je 20 ccm 25 %ige Na Cl-lösung und 2 ccm verd. H Cl zugesetzt; es wird energisch gerührt und dann einige Zeit die Gemische ruhig gestellt. Darauf kommen beide Portionen auf Filter,

wobei sich ein wasserklares Filtrat ergibt. Zum Ausspülen der Gläser, in denen sich die beiden Niederschläge befanden, wurden je 5 ccm phys. Kochsalzlösung verwendet und diese Ausspülungsflüssigkeiten nachträglich noch auf die Filter gebracht. Die ersten 10 ccm beider Filtrate werden durch drei Tropfen Natronhydrat neutralisiert und dann je 2 ccm nach fünffacher Verdünnung mit dest. Wasser mit Katzenblut (2 Tropfen) versetzt. Nach einer halben Stunde ist noch nicht die Spur Hämolyse erfolgt, dagegen ergaben Kontrollversuche mit 5% NaCl, die weit kleinere Saponinmengen enthielten, als sie hier zu erwarten waren, sehr wohl Hämolyse. Die Reste der neutralisierten Filtratproben wurden sodann eine halbe Stunde lang mit je 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zerkocht und auf Sapogenin und Zucker untersucht. Es entsteht aber so gut wie kein unlöslicher Niederschlag von Sapogenin; auch mit Fehling läßt sich nicht deutlich Zucker nachweisen: erst nach viertelstündigem Kochen ergibt die Fehlingsche Lösung eine ganz geringe Reduktion. Die Rückstände wurden dann nochmals mit 5 ccm phys. NaCl gewaschen und anschliessend an der Saugpumpe der letzte Rest der Flüssigkeit abgenommen.

Die Gesamtmenge des Filtrates, welche 4mal mit Blut und 2mal mit Hilfe der Zuckerabspaltung durch Erhitzen mit starker Schwefelsäure geprüft wurde, ergab also weder Hämolyse noch unzweideutige Fehlingsche Probe. Es muß also geschlossen werden, daß die Gesamtmenge der 36 mg Quillajasaponine sozusagen in den Niederschlägen steckt und zwar als Komplexverbindung oder durch Adsorption.

Nun wird der braune feste Filterrückstand der ersten Probe in einer Reibschale mit Alkohol angerührt, der resultierende Brei aufs Filter gebracht und das dunkelgelbe Filtrat nach dem Neutralisieren auf dem Wasserbade eingedampft. Der mit phys. NaCl angeriebene Verdunstungsrückstand wird filtriert; das Filtrat ist wasserklar. Auf Zusatz von 2 Tropfen Katzenblut zu einer Filtratprobe erfolgt weder nach kurzer Zeit noch nach 24 Stunden Hämolyse.

Damit ist bewiesen, daß weder eine in Alkohol lösliche Saponinverbindung noch freie in Alkohol lösliche Saponine vorhanden sind.

Weiter wurde der mit Alkohol erschöpfte Blutkuchen in der Reibschale in phys. NaCl zerrieben und NaOH bis zur dauernden Alkaleszenz des Gemisches zugetropft.

Nach einer halben Stunde wird mit verd. HCl wieder schwach sauer gemacht und nun sofort filtriert. Das sich ergebende wasserklare saure Filtrat wurde neutralisiert und in zwei Teile geteilt. Der erste Teil wird mit 2 Tropfen Blutkörperchen von Pferdeblut versetzt; es tritt keine Hämolyse ein. Die andere Portion wird eine halbe Stunde lang mit verd. Schwefelsäure gekocht und dann auf Zucker und Sapogenin geprüft. Jedoch entsteht kein unlöslicher Sapogeninniederschlag und keine Reduktion der Fehlingschen Lösung.

Durch alkalische Kochsalzlösung, die nachher schwach angesäuert wird, ist also ebenfalls kein Saponin dem Blutkuchen zu entziehen.

Das Gesamtergebnis dieses Versuches muß also folgendermaßen ausgedrückt werden: Aus einem Gemisch von Quillaja-Saponinen und Katzenblut ließ sich weder im Filtrat der Fällung mit Kochsalz und Salzsäure mehr als eine Spur von Saponin nachweisen, noch im Niederschlag überhaupt etwas, obgleich er sowohl mit kaltem und heißem Alkohol als auch mit alkalischer, vor der Filtration aber wieder angesäuerter Kochsalzlösung extrahiert wurde.

Mit ebenfalls negativem Resultate wurde noch in gleicher Weise ein Gemisch von Quillajasaponinen einerseits und Pferdeblutkörperchen, Menschen- und Schweineblut anderseits analog verarbeitet. Es genügt, den ersten der Versuche hier anzuführen.

Pferdeblutkörperchen, Quillajasaponin, 1 %ige Lösung des Handelspräparates in physiol. Kochsalzlösung. 1 ccm = 7,2 mg reine Saponine.

10 ccm Körperchen wurden mit einer sehr großen Menge, nämlich mit 10 ccm 1 %iger Sthamer-Saponinlösung, d. h. mit 72 mg reinen Saponinen gemischt. Momentane totale Hämolyse. Nun wurden 15 ccm 25 %iges NaCl und 5 ccm verdünntes HCl hinzugefügt, wobei ein voluminöser Niederschlag entstand. Das erste Filtrat dieses Niederschlags enthielt ein wenig Saponin, aber doch höchstens den zehnten Teil des zugesetzten. Jetzt wird erst mit 12 %iger und dann mit 6 %iger NaCl-Lösung gewaschen, bis das Filtrat nur noch schwach sauer ist und keine Hämolyse mehr erzeugt. Zur weiteren Prüfung dieses letzten Filtrates auf Saponin wird es mit Schwefelsäure zerkocht; es entsteht jedoch weder Sapogenin noch Zucker. Nun wird der

Blutkuchen-Filterrückstand, der die Hauptmenge des Saponins n gebundener Form enthalten mußte, in zwei Teile geteilt. Die erste Portion wird mit Alkohol zu einem Brei angerieben, erhitzt und heiß filtriert. Nach Neutralisation wird das braune Filtrat eingedampft. Der Verdunstungsrückstand wird in phys. NaCl gelöst, filtriert und zu einer Filtratsprobe ein Tropfen Körperchen gesetzt; es ergibt sich keine Hämolyse. Der zweite Teil wurde alsdann auf dem Filter mit NaOH enthaltender phys. Kochsalzlösung bis zur Alkaleszenz angerührt. Kurz vor dem Filtrieren Neutralisation und Prüfung des Filtrates durch Zusatz eines Tropfens Menschenblut; es tritt jedoch keine Hämolyse ein. Auch bei alkalisch gehaltener Filtration war das Ergebnis dasselbe.

Ergebnis: Auch bei einer Mischung von Pferdeblutkörperchen und Quillaja-Saponinlösung ließ sich nach Entfernung der kleinen Menge ungebundenen Saponins weder im weiteren Filtrat der durch konzentrierter Kochsalzlösung und HCl erzielten Fällung noch im Blutkuchen Saponin nachweisen. Das gebundene Saponin ist also für die genannten Nachweismethoden überhaupt unnachweisbar geworden.

Da ich nun für mein erfolgloses Bemühen zunächst die störende Wirkung des Eiweißes verantwortlich machte, wurde folgendermaßen verfahren:

Pferdeblut, Sthamersaponin 1 % in phys. NaCl.

15 cm³ Pferdeblut, von dem die Hälfte des beim Stehen sich rasch absetzenden, oberschichtigen Serums abpipettiert wurde, werden mit 10 cm³ obiger Saponinlösung = 72 mg Quillajasaponinen vermischt. Zur Ausfällung des Eiweißes wurde das Gemisch nach Zusatz von 100 cm³ phys. NaCl-Lösung auf dem Wasserbade erhitzt und einige Tropfen einer verdünnten Essigsäurelösung bis zur ganz schwach sauren Reaktion und 20 cm³ 25 %ige Kochsalzlösung im Augenblick des Aufkochens zugegeben; nun wird filtriert; das Filtrat geht wasserklar durch. Einer neutralisierten Probe dieses Filtrates wird ein Tropfen Blut zugesetzt; doch tritt keine Hämolyse ein; der Blutkuchen wurde auch wieder vergebens alkalisch, sauer und alkoholisch extrahiert; es geht kein Saponin in Lösung.

Ergebnis: Auch nach Denaturierung des Eiweißes in der Hitze mit verdünnter Essig-

säure läßt sich das Saponin weder im wässrigen Filtrat noch im spirituösen, noch im alkalischen oder sauren Auszug nachweisen; es muß also entweder eine nicht lösliche Eiweißverbindung eingegangen oder noch immer im wesentlichen von dem Stromata durch Bindung an Cholesterin entgiftet sein.

Es wurde nun versucht, ob folgende Modifikation etwa zu einem Ergebnis führen würde.

16 cm³ Katzenblut + 9 cm³ 3 %iges Saponin-Sthamer, enthaltend 21,6 mg reine Quillajasaponine + 25 %ige Kochsalzlösung ad 30 cm³. Die Säure wurde also hier ganz weggelassen. Dieses Gemisch wurde auf dem Wasserbade eine Viertelstunde lang erhitzt und mitunter zum Ersatz des verdunsteten Wassers etwas schwach alkalische Kochsalzlösung beigefügt. Filtration; Filtrat braungelb, es wird neutralisiert und total eingedunstet; Rückstand mit phys. NaCl aufgenommen und filtriert; Filtrat weder für Katzen- noch für menschliches Plazentarblut hämolytisch wirkend.

Das Weglassen der verdünnten Säure beim Erhitzen hat also nichts genützt.

Weiter wurde ein Fällungsversuch mit Chlorzink angestellt.

5 cm 3 %ige Saponinlösung + 10 cm³ Ziegenblut + 5 cm³ gesättigtes Cl_2Zn.

Es tritt eine braune Fällung ein; nach einiger Zeit wird filtriert und das Filtrat gänzlich eingedunstet. Nach dem Erkalten wird der Verdunstungsrückstand mehrmals mit Äther extrahiert und die ätherische Lösung ebenfalls eingedampft. Dieser Lösungsrückstand wurde mit Kochsalz angerieben und neutral mit 2 Tropfen Menschenblut versetzt; es tritt nicht eine Spur Hämolyse ein. Nun wurde der Blut-Niederschlag mit Äther verschiedentlich gewaschen und dann durch Verdunsten von den Resten des Äthers befreit. Die braunen Pulvermassen wurden nun in phys. NaCl gebracht; der neutrale Auszug ist unwirksam, auch der alkalische wie saure, jedoch tritt bei allen eine Art Agglutination ein.

Diese Agglutination beruhte natürlich auf Bildung von Zinkhämoglobin[1]) Durch

[1]) Siehe darüber bei R. Kobert, Pharmaz. Ztg. 1914 Nr. 88, S. 887.

diese Bildung wird der Nachweis des Saponins erschwert, wenn nicht unmöglich gemacht. Es wurde daher die Eiweißfällung mittelst Zink wieder aufgegeben.

Es lag mir jetzt daran festzustellen, ob die Saponine der Quillaja aus ihrer Stromatabindung nach dem Verfahren der beiden Liebermann oder mittelst Alkoholextraktion wiederzugewinnen sind.

Zu diesem Zwecke versetzte ich 10 ccm Katzenblut mit 5 ccm der in Rede stehenden Saponinlösung, entsprechend 0,036 g Saponinen; nach Zusatz von 60 ccm phys. Kochsalzlösung wurde das Gemisch 20 Minuten lang zentrifugiert, um eine schnelle Bodenabsetzung der Stromata zu erlangen. Das in Lösung gegangene Hämoglobin wird sorgfältig abgegossen und abpipettiert, nun wird filtriert; die Stromata wurden teils mit angesäuerter Kochsalzlösung, teils alkoholisch ausgezogen, der Alkohol verdunstet und der Rückstand mit Kochsalz aufgenommen. Eine Probe des mit einem Tropfen Pferdeblutkörperchen versetzten Filtrate ergibt wieder keine Hämolyse.

Ebenso war es unmöglich, aus mit Saponin behandeltem Pferdeblutserum freies Saponin mit Hilfe der Alkoholbehandlung wiederzugewinnen; das Quillaja-Saponingemisch wird also sowohl von Pferdeserum als von Blutkörperchen und Blut verschiedener Tierarten so fest gebunden, daß weder saure Kochsalzlösung noch Alkohol dem Gemisch Saponin zu entziehen imstande ist.

Zu vergleichenden Zwecken wurden auch Versuche mit Kaninchenleber, Hühnereiweiß und Kuhmilch herangezogen, die ich nachstehend anführe.

Die zerstückelte, mit phys. NaCl versetzte und in einem Tuche ausgepreßte Leber eines Kaninchens — die von mir nicht benutzte Preßflüssigkeit enthielt also die Hauptmenge des Blutes — wurde im Mörser unter allmählich steigendem Zusatz von phys. NaCl so weit als möglich zerstampft und auf das Volumen 100 ccm gleichfalls mit NaCl aufgefüllt. Der fast blutfreie Brei wird nach genügendem Schütteln in zwei Teile geteilt, von denen die ersten 50 ccm mit 20 ccm Sthamer (entsprechend 0,144 g reinen Saponinen)

versetzt und die andern 50 ccm zur Kontrolle mit 20 ccm phys. Na Cl gemischt wurden.

Beide Portionen wurden eine zeitlang ruhig gestellt. Zunächst wurde das Kontrollgemisch zur Ausfällung des Eiweißes erhitzt und dann einige Tropfen einer verdünnten Essigsäurelösung zugegeben, wobei sofort flockige Fällung eintritt. Jetzt wird filtriert und das Filtrat neutralisiert; eine Probe des Filtrates wird mit einem Tropfen Blut versetzt; keine Hämolyse. Nun wurde die Saponinportion des Leberzellenbreies erhitzt und wie vorstehend mit Essigsäure behandelt. Nach dem Neutralisieren des Filtrates wird eine Probe davon mit 2 Tropfen Blut versehen, worauf sofortige Hämolyse eintritt.

Bei einem Gemisch von relativ viel Sthamer-Saponin und im wesentlichen vom Blute befreiter Kaninchenleberzellen ließ sich nach Ausfällung des Eiweißes in der Hitze unter Zusatz einiger Tropfen verdünnter Essigsäure im Filtrat reichlich Saponin nachweisen. Den Kaninchenleberzellen läßt sich also durch Kochen und Enteiweißen reichlich zugesetztes Saponin zum größeren Teil wieder entziehen. Wieviel der Zellbrei noch enthielt, wurde nicht geprüft. Bei einem zweiten Versuch hielt eine Kaninchenleber, deren Zellbrei mit 30 mg Saponin versetzt worden war, dies so gut wie vollständig zurück. Kleinere Saponinmengen werden also von Leberzellen wohl gebunden.

Ich lasse einige Versuche mit einigen andern Eiweißarten folgen.

Hühnereiweiß, Sthamer-Saponin 1 % in Kochsalzlösung.

Das Eiweiß eines Hühnereies wurde zunächst mit 100 ccm phys. Na Cl vermischt und durch ein Tuch gepreßt. Von der Preßflüssigkeit werden 60 ccm mit 10 cm³, enthaltend 72 mg Quillaja-Saponine versehen. Zu dieser klargelben Lösung wurden 10 ccm 25 % Na Cl und 5 ccm 10 % HCl hinzugegeben, wobei sich eine milchige Trübung ergab. Anschließend Filtration und Nachwaschen erst mit 12 %igem und 6 %igem Na Cl. Im Filtrat bleibt die Probe auf Hämolyse dauernd positiv.

Das Hühnereiweis ist demgemäß zur Entgiftung der hier in Frage kommenden

Saponinmengen nicht geeignet. Woran dies liegt, muß ich unentschieden lassen.

Kuhmilch, Saponin von Sthamer, 1 % in NaCl gelöst.

20 ccm ungekochter Milch wurden mit 5 cm³, enthaltend 36 mg reine Saponine, vermischt. Nach 10 Minuten wurde das Gemisch mit einigen Tropfen einer verdünnten Salzsäurelösung angesäuert und filtriert; auf Zusatz eines Tropfen Blutes zu einer kleinsten Probe des neutralisierten Filtrates erfolgt umgehend Hämolyse.

Milch wirkt also auf die Saponine der Quillaja nur wenig oder gar nicht entgiftend.

Bei einem zweiten Versuch werden 10 cm³ rohe Milch mit 5 cm³ der 1 %igen Lösung des Sthamerschen Präparates, entsprechend 36 mg reiner Saponine erhitzt und beim Kochen 2 Tropfen verdünnter Salzsäure zugesetzt. Vom wasserklaren Filtrat enthielt schon 1 cm³ genug Saponin um 10fach mit physiol. Kochsalzlösung verdünnt 2 Tropfen Hammelkörperchen langsam aber total zu hämolysieren.

Bei einem dritten Versuche wurden 10 cm³ kalte rohe Milch mit 10 cm³ physiol. Kochsalzlösung, in der 18 mg reine Quillajasaponine enthalten waren, gemischt und ohne Erwärmen 2 Tropfen verdünnter Salzsäure zugesetzt. Nach Umschütteln wird filtriert; das klare saure Filtrat wird neutralisiert und sowohl biologisch als chemisch auf Saponin untersucht. Schon 2 cm³ genügen, um mit 2 Tropfen Meerschweinchenblut oder 1 Tropfen Hammelblutkörperchen bei 5 cm³ Volumen binnen 1 Stunde totale Hämolyse zu geben. Zerkochen von 5 cm³ des Filtrates mit Schwefelsäure ergibt Sapogeninabscheidung und die Lösung dieses Sapogenins wirkt hämolytisch.

Diese Versuche mit Milch, mit und ohne Kochen, sowie die mit Hühnereiweiß zeigen, daß Kolloidsubstanzen an sich, auch wenn sie eiweißiger Natur sind, keineswegs deshalb eo ipso beim Koagulieren größere Mengen von Saponinen unwirksam machen. Da gerade die beiden von mir gewählten Eiweißarten gleichzeitig auch Cholesterin enthalten, tritt der Unterschied, den das Blut bietet, um so stärker hervor. Wir kommen also zu dem Ergebnis, daß das Blut in ganz spezifischer Weise die Eigenschaft hat, die Quillajasaponine in kleinen Mengen so umzuwandeln oder an

sich zu ketten, daß ihre hämolytische Fähigkeit durch direktes Ausziehen mit Wasser, mit verdünnter Salzsäure und mit Alkohol nicht mehr nachweisbar ist.

Nun erst kommen wir zu der Frage, ob die Quillajasaponine aus dem Blute nach der dritten der S. 19 bis 20 besprochenen Methoden, d. h. durch energische Äther- oder Chloroformbehandlung des Blutkuchens wieder frei gemacht und nachweisbar werden, wenn alsdann mit alkalischer Kochsalzlösung ein Auszug gemacht wird. In diesem Sinne stellte ich die nächsten Versuche an.

20 cm^3 heiß gesättigte alkoholische Lösung von Sthamerschen Quillajasaponinen + 10 cm^3 1%ige alkoholische Cholesterinlösung werden gemischt. Es entsteht ein Niederschlag von Saponincholesterid. Nach 24 Stunden wird filtriert, der Niederschlag mit Äther vielmals gewaschen und sodann in physiol. Kochsalzlösung gelöst. Er wirkt sehr stark und rasch hämolytisch auf Menschen- und Kaninchenblut.

Ergebnis: Die Cholesteride der Quillajasaponine sind in Alkohol unlöslich, werden aber durch Äther dissoziert. So wird das Saponingemisch wieder frei und wirksam.

Nun stelle ich einige Versuche mit Quillajasaponinen und Blut an.

4 ccm Saponinlösung Sthamer 1%ig in physiol. NaCl + 8 ccm Menschenblut.

Es folgt sofortige totale Hämolyse; das Gemisch wird $^1/_4$ Stunde lang ruhig gestellt. Dann in 100 ccm schwach sauere kochende Kochsalzlösung gebracht. Nach mehrminutlichem Kochen wird heiß filtriert; das wasserklare Filtrat wirkte nicht hämolytisch. Abgesaugter Rückstand zunächst zur Entfernung des letzten Wassers und des nicht gebundenen Saponins mit Alkohol gewaschen, dann mit Äther ausgekocht, weiter auf dem Filter bis zum Schwinden der Cholestolreaktion mit Äther gewaschen. Blutrückstand auf dem Wasserbade vom letzten Äther befreit und im Mörser zu einem feinen gelben Pulver zerrieben. Das Pulver wird zunächst neutral mit Kochsalzlösung ausgezogen; es erfolgt in einer Probe des Filtrats jedoch auf Zusatz von 1 Tropfen

Menschenblut keine Spur von Hämolyse; dann wird sauer extrahiert; jedoch auch dieser Auszug ist unwirksam. Anschliessend findet alkalische Extraktion statt; die erste Portion des Filtrates, die noch nicht recht alkalisch ist, wirkt neutralisiert auf Zusatz eines Tropfens Blut noch nicht lösend, die zweite etwas alkalischere Portion mit ClH neutralisiert, wirkt aber momentan hämolytisch.

Ergebnis: 28 mg reine Quillajasaponine wurden von 8 ccm Menschenblut beim Koagulieren durch kochende saure Kochsalzlösung völlig gebunden, so daß das Filtrat saponinfrei war. Dieses an den Blutkuchen gebundene Quillajasaponin kann nach Heißätherbehandlung, wodurch das überschüssige Cholesterin entfernt und das gebundene Saponin dissoziiert wird, nicht mittelst Salzsäure, wohl aber durch Sodaauszug wiedergewonnen werden.

Analog verlief folgender Versuch:

5 ccm Schweineblut + 2,5 ccm Saponin-Sthamer 1% + 15 ccm Alkohol; Filtration. Erstes Filtrat da unwirksam, nicht weiter verarbeitet. Im Alkoholauszug des Blutkuchens kein Saponin zu finden; nun Extraktion mit kochendem Äther. Der auf diese Weise von Cholesterin befreite Blutkuchen wird erst sauer mit phys. Kochsalz ausgezogen; der Auszug ist unwirksam; der alkalische Auszug ergibt nach Neutralisieren Hämolyse für Schweine- und Hundeblut.

Versuche mit andern Blutarten zeigten sich entsprechend der Verschiedenheit bezgl. ihrer Saponinempfindlichkeit nur quantitativ verschieden; jedenfalls konnten in allen Fällen mit Hilfe der Heißäthermethode mit folgender zunächst saurer dann alkalischer Extraktion die Saponine der Quillaja ohne Zweifel wiedergewonnen werden.

Zum Schluß folge noch ein Versuch, in dem die etwaige störende oder begünstigende Anwesenheit von Formaldehyd näher untersucht wurde. Dabei ergab sich, daß aus einem Gemisch von 20 ccm konzentriertem Pferdeblut und 5 ccm 1%igem Saponin-Sthamer in

1%iger Lösung bei nachträglichem Zusatz von 1 ccm 35% Formaldehyds und 24stündiger Einwirkung dieser Substanz das Saponin trotzdem schließlich wiedergewonnen wurde; der saure Auszug enthielt, trotz Ätherbehandlung wie immer nichts, wohl aber der alkalische. Begünstigend wirkte die Anwesenheit von Formaldehyd auf die Wiedergewinnung des Saponins zweifellos nicht.

Mehr als ein Jahr, nachdem vorstehende Versuche angestellt worden waren, wurde vorurteilsfrei eine neue Reihe angestellt, die ich jetzt folgen lasse:

10 cm^3 frisches Schweineblut, fibrinfrei wie das Blut aller Versuche meiner Arbeit, werden mit 5 cm^3 1%iger Lösung von Sthamerschem Quillajasaponin, entsprechend 36 mg reinen Saponinen, gemischt. 5 Stunden, nachdem völlige Hämolyse eingetreten ist, werden unter starkem Umrühren 40 cm^3 11%ige ClNa-Lösung und 2 cm^3 verd. Salzsäure zugesetzt. Zur Kontrolle wird dasselbe Gemisch nur ohne Blut hergestellt und auf gleiches Volumen durch Zusatz von physiol. Kochsalzlösung gebracht. In dieser Kontrollflüssigkeit erfolgt keine Trübung, also auch keine Ausfällung von Quillajasäure. Dazu hätte die Salzmenge viel größer sein müssen. 1 cm^3 dieser Kontrollflüssigkeit nach vorheriger Neutralisation genügt um auf 10 cm^3 verdünnt sofort totale Hämolyse von 4 Tropfen Menschenblut zu veranlassen. Nun preßte ich die Blutmischung durch Leinwand, filtrierte nach vorheriger Neutralisation die Preßflüssigkeit und prüfte das wasserklare Filtrat in zweierlei Weise. 1—5 cm^3 davon zeigten auf 10 cm^3 verdünnt keinerlei hämolytische Wirkung für Menschenblutkörperchen. Der gesammte Rest des Filtrates wird mit verd. Schwefelsäure eine Stunde lang zerkocht, um Sapogenin zu gewinnen. Es läßt sich jedoch nach dieser Zeit kein Sapogenin nachweisen.

Nun wird der Preßkuchen mit Alkohol heiß ausgezogen und der neutralisierte Alkohol verdunstet. Der gesammte Rückstand in 5 cm^3 physiol. Kochsalzlösung gelöst ruft mit 1 Tropfen Menschenblutkörperchen versetzt nur langsam partielle Hämolyse hervor, ist also fast saponinfrei.

Der mit Alkohol erschöpfte Preßkuchen wird fein zerrieben, mit Aether in einen Erlenmeyer-Kolben gespült und dreimal mit Aether ausgekocht und jedesmal dazwischen abgespreßt. Die verdunsteten ersten zwei Aetherauszüge ergeben starke Cholesterinreaktion, der dritte war noch spurweiß.

Nach Verjagen der letzten Aetherreste wird der Kuchen von neuem zu Pulver zerrieben und zweimal mit je 15 cm³ schwach angesäuerter physiol. Kochsalzlösung ausgezogen. Die vereinigten neutralisierten und filtrierten Auszüge ergeben weder mit Menschenblutkörperchen Hämolyse noch beim Zerkochen mit verd. Schwefelsäure Sapogenin.

Nun wird der Kuchen mit 20 cm³ schwach alkalischer Kochsalzlösung verrieben und darauf geachtet, daß die alkalische Reaktion des Breies dabei nicht ganz verloren geht. Nach halbstündigem Stehen des Breies wird abgepreßt, neutralisiert und filtriert. Vom wasserklaren Filtrat genügt schon 1 cm³ um in mit 2 Tropfen Menschenblut versetzten 4 cm³ physiol. Kochsalzlösung nach kurzer Zeit totale Hämolyse hervorzurufen. Der Rest des Filtrates ergibt beim Zerkochen mit verd. Schwefelsäure binnen 1 Stunde reichliche Sapogeninabscheidung. Das Natronsalz dieses Sapogenins wirkt hämolytisch.

Dieser Versuch beweist von neuem unzweifelhaft, daß beim kalten Fällen von Blut mit starken Salzlösungen bei Anwesenheit von Mineralsäure die Saponine der Quillajarinde in einer wasserunlöslichen Form mit niedergerissen werden. Auch Alkohol vermag sie nur spurweis dem Kuchen zu entziehen. Nach energischer Behandlung mit warmem Äther werden sie dagegen für alkalische Kochsalzlösung wieder zugängig, für angesäuerte merkwürdiger Weise aber nicht.

10 cm³ Schweineblut werden mit 3 cm³ 1%igem Sthamerschen Quillajasaponin versetzt und dies Gemisch eine Stunde später in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung langsam eingegossen. Unter Umrühren werden dann noch 5 cm³ gesättigte Kochsalzlösung und 5 Tropfen verd. Salzsäure zugesetzt. Das kochende Gemisch wird alsdann sofort auf Leinwand gegossen und abgepreßt. Die Preßflüssigkeit wird neutralisiert und filtriert. Das wasserklare Filtrat wird wie im vorigen Versuche biologisch (mit Hammelblutkörperchen) und chemisch geprüft. Es erweist sich saponinfrei.

Der Alkoholauszug des Preßkuchens wird wie im vorigen Versuche gewonnen und geprüft. Er ergibt gar keine Wirkung auf Hammelblutkörperchen,

Nach dreimaligem Auskochen mit Äther wird der getrocknete

Kuchen erst mit 15 cm³ saurer Kochsalzlösung, dann mit 15 cm³ neutraler und schließlich mit 15 cm³ alkalischer ausgezogen. Nur der (natürlich neutralisierte) alkalische Auszug ergibt Hämolyse für Hammelblutkörperchen und für Menschenblut.

Dieser Versuch zeigt, daß auch bei Koagulation in der Hitze die Saponine der Quillaja unlöslich an den Blutkuchen gebunden werden, wofern starke Kochsalzlösung und verd. Salzsäure gleichzeitig zugesetzt werden. Alkoholbehandlung nützte hier gar nichts. Nach Auskochen mit Äther war saures und neutrales Ausziehen mit physiol. Kochsalzlösung ohne Erfolg; alkalische Kochsalzlösung brachte dagegen die verschwunden gewesenen Saponine wieder zutage.

10 cm³ Plazentarblut werden mit 3 cm³ 1%iger Lösung von Sthamerschem Quillajasaponin versetzt und nach 20 Minuten in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung gegossen, wobei nur 1 cm³ gesättigte Kochsalzlösung und nur 3 Tropfen verdünnte Salzsäure (12,5%ige) zugesetzt werden. Die sofort auf Leinwand gegossene Mischung liefert ein fast farbloses Kolaturfiltrat, in dem sich kein Saponin nachweisen läßt.

Um festzustellen, ob etwa alkalische Kochsalzlösung auch ohne vorhergehende Ätherbehandlung Saponin in Lösung bringt, wird mit 25 cm³ schwach sodaalkalischer Kochsalzlösung der Preßkuchen extrahiert. Das neutralisierte Filtrat wirkt jedoch auf Hammelblutkörperchen nicht.

Nun wie bei den beiden vorhergehenden Versuchen erst Alkoholbehandlung, dann Ätherbehandlung, dann erneute Behandlung mit alkalischer Kochsalzlösung. Der Alkoholauszug enthielt etwas Saponin, der alkalische Kochsalzauszug aber noch mehr.

Dieser Versuch zeigt, daß zur Wiedergewinnung der Quillajasaponine die Ätherbehandlung selbst dann nicht umgangen werden kann, wenn die Menge der Salzsäure und des Kochsalzes minimal war.

Es kam jetzt darauf an, den Anteil der Blutkörperchen und des Serums an der Fixierung der Saponine gesondert zu prüfen.

10 cm³ durch Zentrifugieren und dreimaliges Waschen gewonnene Menschenblutkörperchen werden mit 3 cm³ 1%iger Lösung von Quillajasaponin in physiol. Kochsalzlösung versetzt und nach einer halben Stunde langsam in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung gegossen, der dann noch 10 cm³ 11%ige Kochsalzlösung und 5 Tropfen verdünnte Salzsäure zugesetzt werden. Gleich darauf wird das Gemisch durch Leinwand koliert und abgepreßt. Die neutralisierte Kolatur wird filtriert und mit Hammelblutkörperchen geprüft. Sie besitzt keine hämolytischen Eigenschaften und ergibt beim Zerkochen kein Sapogenin.

Nun wird der Preßkuchen mit Alkohol ausgezogen. Der in physiol. Kochsalzlösung gelöste Verdunstungsrückstand des Alkoholauszuges wirkt auf Menschenblut nicht hämolytisch.

Jetzt wird dreimal warm mit Äther ausgezogen; das Filtrat des in physiol. Kochsalzlösung gelösten Verdunstungsrückstandes wirkt ebenfalls nicht hämolytisch.

Endlich wird der vom Äther befreite Preßkuchen getrocknet und dreimal mit je 15 cm³ physiol. Kochsalzlösung ausgezogen; das erstemal unter Zusatz von 3 Tropfen verd. Salzsäure, das zweitemal unter Zusatz von 5 Tropfen Natronlauge und das drittemal unter nochmaligem Zusatz von 5 Tropfen Lauge. Die drei Filtrate werden neutralisiert und mit Menschenblut geprüft. Nur das dritte wirkte hämolytisch.

Dieser Versuch zeigt, daß nicht nur Vollblut, sondern auch serumfreie Blutkörperchen das zugesetzte Saponin zu binden vermögen und es erst nach energischer Ätherbehandlung an alkalische Kochsalzlösung, aber nicht an saure abgeben.

Es mußte jetzt von Interesse sein, einen analogen Versuch mit körperchenfreiem Serum anzustellen.

2,5 cm³ 1%ige Lösung von Sthamerschem Quillajasaponin in physiol. Kochsalzlösung werden mit 12 cm³ Plazentarblutserum gemischt. Nach 30 Minuten werden 3 Tropfen verdünnte Salzsäure und 5 cm³ 11%ige Kochsalzlösung zugesetzt und das Gemisch zum Kochen erhitzt. Der dabei entstehende Brei wird abgepreßt, die Preßflüssigkeit neutralisiert und filtriert. Es ergeben sich 15 cm³. Diese werden in 3 Teile geteilt. Zu den ersten 5 cm³ werden 2 Tropfen Menschenblut gesetzt; es erfolgt keine Hämolyse. Zu den zweiten 5 cm³ wird 1 Tropfen

Hammelkörperchen gesetzt, es erfolgt ebenfalls keine Hämolyse. Das letzte Drittel wird mit Schwefelsäure auf Sapogenin zerkocht. Es ergibt sich keine Spur Sapogenin. Es war also in das saure wässrige Filtrat keine Spur von Saponin übergegangen.

Der Preßkuchen wurde jetzt wiederholt mit warmem Alkohol ausgezogen. Der in physiol. Kochsalzlösung gelöste neutralisierte Verdampfungsrückstand wirkte schwach hämolytisch für Hammelkörperchen.

Nun wurde dreimal mit warmem Äther ausgezogen; der in physiol. Kochsalzlösung gelöste Verdunstungsrückstand wirkte nicht hämolytisch.

Der jetzt hergestellte saure Kochsalz-Auszug (15 cm^3) wirkte nach dem Neutralisieren gar nicht hämolytisch, der zum Schluß folgende alkalische aber für Hammelkörperchen wohl, wenn auch nicht sehr stark.

Dieser Versuch zeigt, daß auch körperchenfreies Serum, wie ja von vornherein erwartet wurde, die Quillajasaponine bei der Koagulation durch Erhitzen mit salzsäurehaltiger Kochsalzlösung mit niederreißt und an ein wässriges Filtrat nicht abgibt. Extrahiert man dann mit Alkohol, so wird ein wenig Saponin gewonnen und ein weiteres kleines Quantum bei nachträglicher, auf Ätherbehandlung folgender alkalischer Kochsalzextraktion, dagegen nicht bei Anwesenheit von Salzsäure. Ein Teil des Saponins schien unlöslich im Kuchen stecken geblieben zu sein.

Eine Wiederholung dieses Versuches, wobei statt Menschenserum Hammelserum benutzt wurde und die quantitativen Verhältnisse dieselben waren, ergab bei ganz gleichem Verfahren ebenfalls geringe Saponinausbeute im alkoholischen und im alkalischen wässrigen Auszug.

Ich lasse nun einige Versuche folgen, bei welcher das Wiedergewinnungsverfahren aus Blut vereinfacht wurde, indem auf dies Abpressen der Abkochung mit Kochsalzlösung ein Auskochen mit Methylalkohol folgte.

Es war anzunehmen, daß im heißen Methylalkoholauszug ein Teil des gebundenen Saponins oder sogar die Gesamtmenge enthalten sein würde, denn heißer Methylalkohol ist das beste Lösungsmittel für Saponine und einige ihrer Derivate. Dieser Auszug wurde neutralisiert zur Trockne verdunstet, der Rückstand teils trocken, teils in wenig wasserfreiem Methylalkohol aufgenommen mit viel Äther versetzt, wobei freies und durch Dissociation frei werdendes Cholesterin im Äther sich lösen, die Saponine ungelöst bleiben bezw. ausfallen mußten.

10 cm³ Menschenblut der Placentargefäße werden mit 3 cm³ der 1%igen Lösung von Sthamerschem Quillajasaponin in Kochsalzlösung versetzt und nach 10 Min. in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung gegossen, der dann 3 Tropfen verdünnte Salzsäure und 5 cm³ 11%ige Kochsalzlösung noch zugesetzt werden. Nach 2 Minuten wird koliert und abgepreßt. Die neutralisierte und filtrierte Kolatur wirkt weder auf Hammelkörperchen noch auf Menschenblut hämolytisch. Dies steht also in guter Übereinstimmung mit den vorhergehenden Versuchen.

Nun folgt das oben beschriebene Auskochen des Preßkuchens mit Methylalkohol und die Ätherbehandlung des Rückstandes. In der Tat wirkte der in Äther unlösliche Teil nach Lösung in physiol. Kochsalzlösung prompt auf Menschenblut.

Dieser Versuch wurde alsdann mit Hammelblut wiederholt und ergab dasselbe Resultat.

Gesamtergebnis.

Das Gemisch der Quillajasaponine, welches im Sthamerschen Handelssaponin vorliegt, wird bei Mengen bis zu 30 mg des Handelspräparates d. h. bis zu 21 mg reiner Saponine von 10 cm³ Blut- oder Serum oder Blutkörperchen sowohl bei kalter Fällung durch verd. Salzsäure und starke Kochsalzlösung als auch bei Koagulation in der Hitze quantitativ fest gebunden und geht nicht ins wässrige Filtrat über. Auch an Alkohol

wird nur sehr wenig, oft sogar gar nichts abgegeben. Behandelt man aber den Kuchen energisch mit Äther in der Wärme bis alles Cholesterin entfernt ist, so läßt sich durch Extraktion zwar nicht mittelst saurer oder neutraler, wohl aber mittelst alkalischer Kochsalzlösung das Saponingemisch wiedergewinnen.

Auch Auskochen des Preßkuchens mit Methylalkohol und nachherige Behandlung des Verdunstungsrückstandes oder der konzentrierten Methylalkohollösung mit Äther führt zu demselben Ziele. Wären die Saponine nur an Cholesterin gebunden, so müßte nach der Ätherbehandlung auch saures oder neutrales Extrahieren mit Wasser oder physiol. Kochsalzlösung diese Saponine in Lösung bringen. Da dies niemals der Fall war, müssen die Saponine außer an Cholesterin auch noch wie eine Base an Eiweißstoffe des Blutes gebunden sein und werden offenbar nur durch Zusatz einer anorganischen Base freigemacht. Diese Freimachung gelingt vor der Entcholesterinisierung nicht.

III. Wiedergewinnung von Sapindussaponin.

Ich benutzte zu diesen Versuchen das Saponin des Sapindusfruchtfleisches, welches die Firma Hoffmann-La Roche & Comp. in den Handel bringt. Es ist ein weißes Pulver, welches nur geringe Mengen von Unreinigkeiten enthält. Ich benutzte eine 1 %ige Lösung in physiol. Kochsalzlösung. Aus welcher Spezies von Sapindus es dargestellt ist, ist auf dem Etikett nicht angegeben.

Entsprechend den S. 27 erwähnten Versuchen mit Milch und Quillajasaponinen schien es mir interessant hier analog zu verfahren.

10 cm³ rohe Kuhmilch wurden mit 10 cm³ Kochsalzlösung, die 25 mg Sapindussaponin enthielt, versetzt und 24 Stunden sich selbst überlassen. Alsdann wurde 1 Tropfen Essigsäure zugesetzt und aufgekocht, wobei die Eiweißsubstanzen flockig ausfielen. Es wurde noch heiß filtriert und das neutralisierte wasserklare Filtrat auf hämolytische Kraft mit einigen Tropfen Hühnerblut geprüft. Es erfolgte prompte Hämolyse.

In einem zweiten Versuche wurden 10 cm³ rohe Milch mit 2.5 cm³ 1 %iger Lösung von Sapindussaponin in Kochsalz und dann noch mit 7,5 cm³ physiol. Kochsalzlösung (ohne Saponin) versetzt. Vier Stunden später wurden 2 Tropfen verd. Salzsäure zugesetzt, ohne Erhitzen gut durchgeschüttelt und filtriert. Das Filtrat wird neutralisiert, nochmal filtriert und bildet dann eine wasserklare Flüssigkeit. Schon 2 cm³ davon mit 8 cm³ physiol. Kochsalzlösung versetzt, rufen nach Zusatz von 4 Tropfen Plazentarblut des Menschen bzw. von 2 Tropfen Hammelblutkörperchen nach kurzer Zeit totale Hämolyse hervor. Der Rest des Filtrates gab nach dem Zerkochen mit verd. Schwefelsäure reichliche Abscheidung von Sapogenin.

In einem dritten Falle wurden dieselben Mengen von Milch und von Sapindussaponin erhitzt und dann 4 Tropfen verdünnte Salzsäure zugesetzt. Das neutralisierte Filtrat rief schon in ganz kleinen Mengen (1 cm³ + 9 cm³ phys. Kochsalzlösung) Hämolyse von Hammelkörperchen binnen 10 Min. hervor. Der Rest des Filtrates gab beim Zerkochen mit verd. Schwefelsäure reichliche Abscheidung von Sapogenin.

Ergebnis: Milch vermag trotz ihres Cholesteringehaltes weder Quillajasaponine noch Sapindussaponin nach dem Koagulieren zu binden.

Ich stellte jetzt weiter fest, ob das Sapindussaponin ein Cholesterid bildet, das in Alkohol unlöslich ist.

Zu diesem Behufe mischte ich 10 cm³ heiß gesättigte Lösung von Sapindussaponin in Alkohol mit 10 cm³ heiß gesättigter Lösung von Cholesterin in Alkohol. Es entstand sofort eine Trübung, auf die dann eine geringe Niederschlagsbildung folgte. Dieser der Wandung fest anhaftende Niederschlag wurde nach Abgießen des Alkohols mit Äther oftmals gewaschen, wobei er sichtlich abnahm. Dieser geringe Rückstand wurde dann mit 10 ccm³ physiol. Kochsalzlösung übergossen, wobei er sich sofort ganz auflöste. Schon 3 cm³ davon genügten, um auf 5 cm³ verdünnt 2 Tropfen Menschenblut sofort zu lösen.

Ergebnis: Sapindussaponin bildet ein in Alkohol unlösliches Cholesterid, das von Äther rasch dissoziiert wird. Das Cholesterin löst sich und reines Saponin bleibt zurück, das nun in Kochsalzlösung gelöst hämolytisch wirkt.

Unter solchen Umständen erschien es aussichtsvoll auch Blutversuche zu machen.

15 cm³ serumarmes Pferdeblut + 45 cm³ physiol. ClNa-Lösung + 10 cm³ 1 %ige Sapindussaponinlösung werden gemischt. Es erfolgt rasch totale Hämolyse. Nach halbstündigem ruhigen Stehen wird das Gemisch in eine Schale mit 100 cm³ kochender physiol. Kochsalzlösung, die mit einigen Tropfen verd. Essigsäure angesäuert ist, gegossen, wobei nach kurzem Kochen ein voluminöses, braunes, flockiges Koagulum sich abscheidet. Das gelbliche Filtrat gibt beim Neutralisieren einen geringen Niederschlag. Nochmaliges Filtrieren liefert eine wasserklare neutrale Flüssigkeit. 5 cm³ davon mit 2 Tropfen Pferdeblut versetzt geben nicht die geringste Hämolyse. Dreimaliges Auskochen des Filterrückstandes mit Alkohol liefert nur beim ersten Male nach Verdunsten des Alkohols einen geringen hellbraunen Rückstand, der mit physiol. Kochsalzlösung verrieben, neutralisiert und filtriert hämolytisch wirkt. Die folgenden 2 Auskochungen ergaben nichts mehr. Die nachher vorgenommene Extraktion des Kuchens mit alkalischer Kochsalzlösung ergibt kein wirksames Saponin, auch nicht, wenn vorher der Kuchen mit Äther erschöpft wurde.

Ergebnis: Aus einem durch Kochen und Ansäuern koagulierten Gemische von Sapindussaponin und Pferdeblut ging kein Saponin ins wässrige Filtrat, wohl aber etwas in die alkoholische Auskochung über. Es muß also angenommen werden, daß eine in Wasser ganz unlösliche Verbindung eingetreten ist, während Alkohol etwas davon in wirksamer Form auszog. Durch Erschöpfung mit Äther, die auf den Alkohol folgte, wurde kein für alkalische Kochsalzlösung zugängiges Saponin frei gemacht. Dies ist ein wichtiger Unterschied gegenüber den Versuchen mit den Quillaja-

saponinen. Zur Erklärung dieses verschiedenen Verhaltens vermag ich nichts beizubringen. Ich muß mich begnügen die Tatsache zu konstatieren. Wenn auch nicht gerade alle Versuche nach der Ätherbehandlung kein durch alkalische Kochsalzlösung extrahierbares Saponin ergaben, so war es doch die Mehrzahl. Ich führe sie kurz hier an, lasse dabei aber alles früher schon wiederholt im einzelnen Besprochene weg. Ein Teil dieser Versuche liegt mehrere Semester zurück, andere wurden erst ganz vor kurzem ausgeführt.

10 cm³ Rinderblut + 20 mg Sapindussaponin. Koagulation durch reichlichen Alkoholzusatz. Das abgepreßte Alkohol enthielt fast kein Saponin. Ätherbehandlung. Extraktion mit neutraler und mit alkalischer Kochsalzlösung liefert kein Saponin.

10 cm³ Rinderblut + 20 mg Sapindussaponin. Zusatz von 5 Tropfen verd. Salzsäure, dann von viel Alkohol. Weitere Behandlung wie im vorigen Versuch. Weder im alkoholischen Auszug noch in dem mit alkalischer Kochsalzlösung Saponin sicher nachweisbar, auch nicht mit der dieses Saponin von allen andern Saponinen unterscheidenden sehr empfindlichen von Kobert vor vielen Jahren gefundenen und von Kruskal[1]) beschriebenen Reaktion mit starker Salzsäure, wobei intensive Rotfärbung eintritt. Erwärmen des Gemisches steigert die Empfindlichkeit.

10 cm³ Menschenblut + 50 mg Sapindussaponin werden nach eingetretener Hämolyse in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung getropft und dann noch 5 Tropfen verd. Salzsäure und 5 cm³ gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt. Da 50 mg Saponin von 10 cm³ Blut nicht gebunden werden können, enthält die Preßflüssigkeit Saponin, jedoch höchstens die Hälfte des zugesetzten. Die andere Hälfte kann durch Behandeln mit Alkohol (darin ein Rest des ungebundenen), Äther und alkalischer Kochsalzlösung nicht wiedergewonnen werden.

10 cm³ Meerschweinchenblut + 40 mg Sapindussaponin + 20 cm³ gesättigte Kochsalzlösung + 20 Tropfen verd. Salzsäure. Keine Erhitzung, sondern kaltes Abpressen. In der Preßflüssigkeit kein Saponin. Der nun folgende dreimalige

[1]) Arbeiten des pharmakol. Inst. zu Dorpat, hsg. von R. Kobert, **6**, 1891, S. 20.

heiße Alkoholauszug enthält in der ersten und zweiten Portion etwas Saponin. Nun dreimaliges Auskochen mit Äther, dann dreimaliges Ausziehen mit je 15 cm physiol. Kochsalzlösung, erst sauer, dann neutral, dann alkalisch. Keiner dieser drei Auszüge enthält Saponin.

10 cm³ serumarmes Menschenblut + 25 mg Sapindussaponin werden nach erfolgter Hämolyse in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung gegossen und allmählich 15 cm³ 11 %ige Kochsalzlösung und 6 Tropfen verdünnte Salzsäure zugesetzt. Die Preßflüssigkeit neutralisiert und filtriert gibt mit Menschenblut keine Hämolyse und eingedunstet keine Rotfärbung mit starker Salzsäure. Der Alkoholauszug des Preßkuchens gibt keine deutliche Saponinreaktion. Nun wird dreimal mit Aether warm ausgezogen und dann zweimal mit Kochsalzlösung, das erstemal sauer, das zweitemal alkalisch. Beide Auszüge erweisen sich als saponinfrei. Es wurde in diesem Falle also nirgends Saponin gefunden.

10 cm³ körperchenfreies gelbes Menschenserum aus Plazentarblut + 25 mg Sapindussaponin. Nach 4stündigem Stehen werden das gleiche Volumen 5 %ige Kochsalzlösung und 3 Tropfen Salzsäure zugesetzt und langsam auf 70° C. erhitzt. Der dabei entstehende Brei wird abgepreßt und die Preßflüssigkeit filtriert. Sie wirkt weder auf Hammelkörperchen noch auf Menschenblut lösend. Der jetzt folgende alkoholische Auszug liefert ebenfalls kein Saponin. Das gleiche gilt vom ätherischen Auszug. Nun wird 2mal mit physiol. Kochsalzlösung, erst sauer, dann alkalisch ausgezogen. Auch dabei wird kein Saponin zutage gefördert. Das Serum hatte also das Sapindussaponin ganz zum Verschwinden gebracht.

10 cm³ völlig hämoglobinfreies Menschenserum aus Plazentarblut + 25 mg Sapindussaponin. Nach ½ Stunde Erhitzen im Wasserbad unter Zusatz von 3 Tropfen verd. Salzsäure für 5 Minuten. Die Preßflüssigkeit ergibt keine Hämolyse mit Menschenblut, wohl aber der Verdunstungsrückstand des Akoholauszugs, wenn auch nur langsam. Nun wird mit warmem Äther und dann erst mit salzsaurer und zuletzt mit alkalischer Kochsalzlösung ausgezogen. Keiner dieser Auszüge ergibt Saponin. In diesem Falle hatte also nur der alkoholische Serumauszug ein wenig Saponin ergeben.

10 cm³ serumfreie Menschenblutkörperchen aus Plazentarblut + 3 mg Sapindussaponin. Nach erfolgter Hämo-

lyse Zusatz von 5 cm³ 1 1% Kochsalzlösung und 5 Tropfen verd. Salzsäure. Ohne Erhitzen wird abgepreßt. Die Preßflüssigkeit enthält weder nach der biologischen noch nach der chemischen Prüfung Saponin. Aus dem Preßkuchen gelingt es weder mittelst Alkohol noch nach vorheriger Ätherbehandlung mittelst alkalischer Kochsalzlösung eine Spur von Saponin zu gewinnen. In Kontakt mit den Blutkörperchen bezw. mit deren Auflösungsprodukten war also das Sapindussaponin für unsere Methodik völlig unnachweisbar geworden.

10 cm³ serumfreie Menschenblutkörperchen + 10 cm³ physiol. Kochsalzlösung + 30 mg Sapindussaponin. Nach erfolgter Hämolyse wird in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung gegossen, der dann noch 20 Tropfen verd. Salzsäure und 10 cm³ gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt werden. Die neutralisierte und filtrierte Preßflüssigkeit erweist sich als saponinfrei, und zwar sowohl bei biologischer als bei chemischer Prüfung. Der in physiol. Kochsalzlösung aufgenommene Verdunstungsrückstand der Alkoholextraktion des Preßkuchens ergibt mit Hammelkörperchen nur partielle Hämolyse. Es folgt 3maliges Auskochen mit Äther und sodann Ausziehen des Kuchens erst mit schwach saurer, dann mit schwach alkalischer Kochsalzlösung. In keinem dieser Auszüge eine auf Hammelkörperchen hämolytisch wirkende Substanz. Also auch hier war das Sapindussaponin für unsre Methodik im schließlichen alkalischen Kochsalzauszug nicht nachweisbar.

Soviel über die mißglückten Versuche. Positive Ergebnisse mit dem alkalischen Kochsalzauszug erhielt ich nur in drei Versuchen, in denen die Saponinmenge etwas größer war, nämlich 60 mg auf 10 cm³ Menschenblutkörperchen, 90 mg auf 18 cm³ Hammelblut und 45 mg auf 10 cm³ Menschenblut.

Ich komme nun zu den Versuchen, bei denen die schon S. 35 besprochene Methylalkoholmethode angewandt wurde. Ich lasse einen Versuch kurz folgen.

10 cm³ Menschenblut + 30 mg Sapindussaponin. Nach erfolgter Hämolyse Eingießen in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung. Obwohl weder starke Salzlösung noch Salz-

säure zugefügt wird, ist die Preßflüssigkeit saponinfrei. Der Kuchen wird nun zweimal mit Methylalkohol ausgekocht und das Filtrat der vereinigten Auszüge zur Trockne verdampft, der Verdunstungsrückstand mit heißem Äther, der reichlich Cholesterin entfernte, dreimal extrahiert und dann in phys. Kochsalzlösung gelöst. Er wirkt deutlich hämolytisch. Ein anderer Teil wird in starker Salzsäure schwach erwärmt, wobei prachtvolle Rotfärbung eintritt. Ein dritter Teil wird mit verd. Schwefelsäure zerkocht und gibt deutlich Sapogeninabscheidung.

Der Versuch wurde mit Menschenblut-, sowie mit Hammelblutkörperchen bei gleichen Mengenverhältnissen wiederholt und ergab beide Male wieder positives Resultat.

Nach der Methylalkoholmethode läßt sich also das dem Blute zugesetzte Sapindussaponin viel sicherer nachweisen als nach der Alkohol-Äther-Kochsalzmethode. Offenbar ist die Verbindung des Saponins mit Cholesterin in heißem Methylalkohol genügend löslich, so daß sie dem Kuchen entzogen werden kann, trotzdem das Saponin auch an Eiweiß gebunden ist.

IV. Wiedergewinnung von Saponalbin.

Benutzt wurde chemisch reines Saponalbin, welches die Firma E. Merck aus der Radix Saponariae albae darstellt. Betreffs aller Einzelheiten über diese Substanz verweise ich auf Koberts Angaben im Biochemischen Handlexikon.[1])

8 ccm 1 % Saponalbinkochsalzlösung, also 80 mg Saponalbin werden mit 16 ccm Hundeblut und zwar serumarmem, gemischt und nach halbstündigem Stehen in zwei Teile geteilt.

Teil I entspricht 40 mg Saponalbin + 8 ccm Hundeblut. Diese Mischung wird tropfenweise in 100 ccm kochende Kochsalzlösung, der 1 ccm 10fach verdünnte Acid. acet. dil.

[1]) Abderhalden, Biochem. Handlexikon. Bd. 7 (Berlin 1912), S. 177.

zugesetzt ist, gebracht. Nach mehrminutlichem Kochen wird kochend heiß filtriert. Es ergibt sich ein wasserklares Filtrat, das mit 1 ccm konz. H_2SO_4 mehrere Stunden lang gekocht wird, um, falls Saponin anwesend wäre, Sapogenin zu liefern. Es tritt aber nicht die geringste Sapogeninabspaltung ein. Die Gesamtmenge des Saponins muß also im Blutkuchen stecken. Dieser wird zunächst mit phys. Kochsalzlösung, dann mit Alkohol gewaschen und darauf mit Äther im Erlenmeyer ausgekocht; weiter wird er auf dem Filter mit neuem Äther gewaschen, bis der abtropfende Äther keine Cholestolreaktion mehr gibt. Jetzt muß nicht nur das freie Cholesterin, sondern auch das vorher als Cholesterid vorhandene, durch Dissoziation freigewordene Cholesterin in Lösung gegangen sein. Der auf diese Weise mit Äther in der Hitze erschöpfte Blutkuchen wird nun mit 3 Tropfen Natriumkarbonatlösung und 20 ccm phys. ClNa-Lösung ausgezogen. Die ersten 5 ccm Filtrate werden mit 2 Tropfen Menschenblut und die zweiten 5 ccm mit einem Tropfen Hundeblut versetzt. Sie reagieren kaum alkalisch. Beide gaben rasch totale Hämolyse. Die folgenden 2 × 5 ccm ebenfalls. Weitere 15 ccm wurden mit einem ccm verdünnter Schwefelsäure zerkocht. Es scheidet sich nach längerem Kochen ein flockiger Niederschlag, nämlich Sapogenin, ab.

Ergebnis für Teil I: Es gelingt nach der Methode des Eintragens des saponalbinhaltigen Blutes in kochendes Wasser, das etwas Essigsäure enthält, eine völlige Trennung des Gefärbten und Ungefärbten zu erhalten. Im farblosen Filtrat keine Spur von freiem oder gebundenem Saponin. Der Blutkuchen enthält das gesamte Saponin und zwar z. T. als Cholesterid; dieses wird durch energische Behandlung mit kochendem Äther zerlegt und das Saponalbin jetzt für alkalische Kochsalzlösung nachweisbar.

Teil II entspricht ebenfalls 40 mg Saponalbin und 8 ccm Hundeblut. Diese Mischung wird mit Alkohol im Erlenmeyer 3mal erhitzt und jedesmal der Alkohol abfiltriert. Die gelben Filtrate werden eingedunstet und für sich untersucht, der voluminöse Filterrückstand ebenfalls für sich. Letzterer enthält die gesamte Menge des Saponins gebunden. Er wird erst mit Alkohol gewaschen und dann mehrmals mit Äther ausgekocht, bis das Filtrat keine Cholestolreaktion mehr gibt. Der von Äther gänzlich befreite feinzerriebene

Kuchen wird jetzt mit 25 cm³ physiol. Kochsalzlösung (ohne Alkali) ausgezogen. Das Filtrat wirkt nicht hämolytisch. Eine darauf folgende zweite Extraktion mit 25 cm³ sodahaltiger Kochsalzlösung ergibt dagegen ein Filtrat, welches nach dem Neutralisieren auf Kaninchen- und Menschenblut rasch hämolytisch wirkt. Der Rest des Filtrates wird mit verd. Schwefelsäure zu Sapogenin zerkocht. Dabei bildet sich ein flockiger Niederschlag (Sapogenin) und das Filtrat reduziert Fehlingsche Lösung (Zucker). Das gewaschene Sapogenin auf dem Filter gesammelt und in wenig Kochsalzlösung unter Zusatz eines Tropfens Soda gelöst wirkt auf Hammelblutkörperchen hämolytisch.

Ergebnis für Teil II. Das heiß gewonnene Filtrat des koagulierten Hundeblutes enthielt kein Saponalbin. Alkohol vermochte auch kein Saponalbin aus dem Kuchen auszuziehen, wohl aber nach vorheriger Ätherbehandlung alkalische Kochsalzlösung, während nicht alkalische keine Löskraft besaß. Das Saponalbin ist also außer an Cholesterin auch noch irgendwie an Eiweiß gebunden. Diese Bindung wird durch Alkalien zerlegt, nachdem vorher die Bindung an Cholesterin aufgehoben ist.

10 cm³ Hammelblutkörperchen + in 40 cm³ Kochsalzlösung gelöste 35 mg Saponinalbin. Nach ½ Stunde in 200 cm³ kochendes mit 5 Tropfen verd. ClH angesäuertes Wasser langsam eingegossen und dann 20 cm³ gesättigte Kochsalzlösung zugefügt. Es wird heiß koliert und abgepreßt. Das wasserklare Filtrat der neutralisierten Preßflüssigkeit wirkt nicht hämolytisch auf Menschenblut und gibt beim Zerkochen kein Sapogenin. Es folgt Ausziehen in der Hitze mit Methylalkohol und Eindunsten des Auszugs. Der Verdunstungsrückstand wird mit Äther erschöpft und sodann in physiol. Kochsalzlösung neutral gelöst. Schon der zehnte Teil der Lösung wirkt auf Menschenblut hämolytisch; der Rest wird zerkocht und liefert eine voluminöse Ausscheidung von Sapogenin, dessen Natriumsalz in physiol. Kochsalz gelöst hämolytisch wirkt.

Diese Versuche genügen, um zu zeigen, daß auch Saponalbin von Blut beim Koagulieren fixiert wird, so daß die Preßflüssigkeit davon frei ist.

Auch an Alkohol gibt der Preßkuchen nichts Hämolytisches ab, wohl aber an Methylalkohol, allerdings gleichzeitig mit Cholesterin, das erst durch Äther entfernt werden muß, um das Saponin frei werden zu lassen. Läßt man also auf die Alkoholbehandlung des Preßkuchens eine mit heißem Äther folgen, so wird das Cholesterin dem Kuchen entzogen und dadurch das Saponin für alkalische Kochsalzlösung zugängig, aber nicht für neutrale oder saure. Dies zwingt zu der Annahme, daß das Saponalbin im Blute analog dem Sapindussaponin und den Quillajasaponinen außer an Cholesterin noch an eine andere Substanz, wahrscheinlich an Eiweiß, gebunden ist. Die Bindung an letztere wird erst durch Alkali aufgehoben.

V. Wiedergewinnung von anderen Saponinen.

Ich habe in analoger Weise auch noch mit einigen anderen Saponinen Versuche an Blut, wenngleich mit jedem einzelnen nur wenige, angestellt. Ich will über diese hier kurz noch berichten.

1. Herniariasaponin.

25 mg neutrales nach der Bleimethode dargestelltes Herniariasaponin, über dessen starke Wirkung mein Kommilitone Daebler[1]) soeben berichtet hat, werden in 5 cm³ physiol. Kochsalzlösung gelöst und mit 10 cm³ serumarmem Menschenblut vermischt. Nach ½ Stunde wird das Gemisch in 100 cm³ kochende Kochsalzlösung langsam eingetragen und 2 Minuten später das Ganze durch Leinwand koliert. Die Kolatur ist fast farblos, sie reagiert neutral; sie wirkt auf Hammelblutkörperchen nicht hämolytisch. Beim Zerkochen der Gesamtmenge

[1]) Friedr. Daebler, Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung und Wirkung des Bruchkrautes. Dissert. Rostock 1914.

des übrigen Filtrates mit verd. Schwefelsäure bildet sich kein hämolytisch wirksames Sapogenin. Der Blutkuchen wird jetzt mit Methylalkohol zweimal ausgekocht und die heiß gewonnenen Preßflüssigkeiten vereinigt und eingedampft. Diesem Verdampfungsrückstand wird mittelst heißem Äther sein gesamtes Cholesterin entzogen; alsdann wird er in Kochsalzlösung gelöst und mit Hammelkörperchen geprüft; es erfolgt Hämolyse.

Herniariasaponin wird also analog den oben genannten Saponinen von Blut bei der Kongulation festgebunden, kann den Kuchen aber nach der Methylalkohol-Äther-Methode entzogen und wieder frei gemacht werden.

2. Agrostemmasapotoxin.

Betreffs der Literatur dieses für die Landwirtschaft und die praktische Medizin gleich wichtigen Giftes aus der Kornrade verweise ich auf die erschöpfende Darstellung von R. Kobert[1]). Ich benutzte ein Brandlsches Originalpräparat aus Kornradensamen. Die verwandten Mengen und die Methodik war genau dieselbe, wie beim Herniariasaponin. Es genüge, zu sagen, daß auch hier der mit Äther erschöpfte Verdampfungsrückstand der Methylalkoholauskochung des Preßkuchens das Sapotoxin in wirksamer Form enthielt. Das für das Herniariasaponin oben gezogene Ergebnis gilt also auch für das Agrostemmasapotoxin der Kornradensamen. Ein mit dem neutralen Saponin der Kornradenblätter angestellter Versuch, in dem die 6 g trocknen Blättern entsprechende Saponinmenge zur Verwendung kam, versagte wohl nur deshalb, weil diese Menge für 10 g Menschenblut zu gering war, um sicher wiedergefunden zu werden.

[1]) R. Kobert in Abderhaldens Biochem. Handlexikon Bd. 7 (Berlin 1912), S. 172.

3. Assamin.

Assamin ist neben Assamsaponinsäure in den Samen von Thea assamica enthalten und seinerzeit von Halberkann[1]) in unserm Institute eingehend chemisch und biologisch geprüft worden. Die ersten 3 Versuche, bei denen je 4 cm³ konzentrierte Assaminlösung auf 8 cm³ Hundeblut-, Rinderblut- und Katzenblutkörperchen verwendet wurden, ergaben nach dem Eingießen in je 100 cm³ kochende schwach salzsaure physiol. Kochsalzlösung in den 3 Preßflüssigkeiten Assamin, weil die verwandte Saponinmenge viel zu groß war, um von 8 cm³ Blut gebunden werden zu können. Ebenso ergab nach der Ätherbehandlung schon der saure Kochsalzauszug Assamin.

Bei einem weiteren Versuche, wo 25 mg Assamin auf 10 cm³ Hammelblut verwendet wurden, fand sich bei gleicher Behandlung wie oben, nur daß noch 5 cm³ gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt wurden, weder in der Preßflüssigkeit noch im alkoholischen Auszug des Kuchens Saponin. Nach dem Auskochen des Kuchens mit Äther ergab der saure Kochsalzauszug ebenfalls nichts, wohl aber der alkalische.

Mithin scheint sich Assamin wie Agrostemmasapotoxin, Herniariasaponin etc. zu verhalten, d. h. von Blut und Blutkörperchen fest gebunden zu werden und erst nach Ätherauskochung des Kuchens an alkalische Kochsalzlösung abgegeben zu werden.

4. Digitonin.

Nachstehend möge auch über einige Versuche mit dem stark hämolytisch wirkenden, von Merck vor Jahren einmal unserm Institute gelieferten Saponingemisch Digi-

[1]) Jos. Halberkann, Biochem. Zeitschr. Bd. **19**, 1909, S. 44.

tonin, das in den Samen der Digitalis neben Digitalin als Hauptbestandteil vorkommt, berichtet werden. Neuerdings ist es in zwei Saponine zerlegt worden.

10 cm³ ½% Digitoninlösung, also 50 mg der wirksamen Substanzen wurden mit 20 cm³ Kaninchenblut gemischt. Es tritt fast totale Hämolyse ein. Nach längerem Stehen wurden 100 cm³ schwachsaure 0,9%ige und 15 cm³ gesättigte Kochsalzlösung dem klaren Gemisch hinzugegeben. Das gelbe Filtrat wirkt nicht hämolytisch. Nach Abpressen wird der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Im Verdunstungsrückstand des Spiritusauszuges läßt sich kein Saponin nachweisen. Dann wurde der mit Alkohol erschöpfte Blutkuchen mit Äther 3mal ausgekocht. Der sich anschließende 5 cm³ betragende saure Kochsalzauszug ist ganz schwach wirksam, der nun folgende 30 cm³ betragende alkalische erweist sich bei zwei Proben in Mengen von 5 cm³ sofort für Menschenblut deutlich wirksam. Andere Versuche, auch mit 2—3 cm³ Auszug + der gleichen Menge phys. Kochsalzlösung wurden an Pferde- und Hundeblut angestellt und ergaben gleichfalls ein positives Ergebnis.

Somit konnte also auch bei diesem Saponingemisch einerseits die feste Bindung an Blut und andererseits die Dissoziationsmöglichkeit des Digitoninblutcholesterids durch kochenden Äther sicher gestellt werden.

5. Cyclamin.

Auch die Wiedergewinnung des in den Knollen des Alpenveilchens vorkommenden Cyclamins wurde von mir geprüft. Ich lasse kurz einige Versuche folgen und verweise betreffs dieses Saponins auf Tufanow[1]).

20 cm³ Kaninchenblut + 6 ccm 1%iger Cyclaminlösung des Merckschen Präparates, in phys. Na Cl-Lösung gelöst, + 100 ccm schwach saure Kochsalzlösung.

Kochen des Gemisches; Filtration; Filtrat absolut unwirksam.

Dagegen aus dem Niederschlag nach Alkoholwaschung und Ätherextraktion Cyclamin weniger im sauren als im alkalischen Auszug nachzuweisen, ebenso das Sapogenin des Cyclamins im zerkochten alkalischen Auszug.

40 ccm Kalbsblut + 10 ccm 1%iger Cyclaminkochsalz-

[1]) Nik. Tufanow, über Cyclamin. Arbeiten des Pharmakol. Inst. zu Dorpat, hsg. von R. Kobert, **1**, 1888. S. 100.

lösung + 100 ccm kochende schwach saure Na Cl-Lösung. Im Filtrat kein Saponin; im alkoholischen Auszug auch nicht, wohl aber nach energischer Ätherbehandlung aus dem Kuchen mittelst alkalischer Kochsalzlösung erhältlich und nebst dessen Sapogenin nach bekannten Methoden nachweisbar.

120 ccm Hammelblut + 10 ccm 1%iger Cyclaminkochsalzlösung + 200 ccm kochende Kochsalzlösung (schwach sauer). Im Filtrat kein Saponin. Aus dem Kuchen nach Heißätherbehandlung durch alkalisches Ausziehen solches wiederzugewinnen.

Es ergab sich also auch trotz der sehr großen zugesetzten entgiftenden Blutmenge die Möglichkeit, aus dem Niederschlag nach genügender Ätherbehandlung Cyclamin wiederzugewinnen. In die Preßflüssigkeit nach der Hitzekoagulation war es, obwohl keine konzentrierte Kochsalzlösung zugesetzt worden war, nicht übergegangen.

6. Guajaksaponin.

Wie Frieboes[1]) seinerzeit in seiner Preisschrift unseres Institutes nachgewiesen hat, gibt es mehrere Guajaksaponine, nämlich ein saures und ein neutrales Blättersaponin, sowie ein saures und ein neutrales Rindensaponin.

Zu meinen Versuchen diente das neutrale Guajakrindensaponin, welches ich in einer Menge von 25 mg zu 10 cm³ Rinderblut zusetzte. Dies Gemisch wurde in 100 cm³ kochende physiol. Kochsalzlösung eingegossen und dann 5 Tropfen Salzsäure und 10 cm³ 11 %ige Kochsalzlösung zugesetzt. Die heiß gewonnene Preßflüssigkeit enthielt bei chemischer Prüfung kein Saponin, d. h. es bildete sich beim Zerkochen der einen Hälfte kein Sapogenin, und der Verdunstungsrückstand der andern Hälfte gab nicht die von Frieboes als für dieses Saponin sehr charakteristisch erkannte Meckesche Reaktion. Der biologische Nachweis für neutrales Guajakrindensaponin ist nicht scharf, da gerade dieses Saponin außerordentlich schwache hämolytische Eigenschaften hat.

---

[1]) Walter Frieboes, Beiträge zur Kenntnis der Guajakpräparate. Stuttgart 1903. Mit Abbildungen.

Der Blutkuchen wurde in der üblichen Weise erst mit Alkohol, dann mit Äther warm ausgezogen. Der Alkoholauszug enthielt kein Saponin, wohl aber der nach der Ätherverdunstung hergestellte alkalische Kochsalzauszug, denn er gab die Meckesche Reaktion.

Dieser Versuch zeigt, daß auch das neutrale Guajaksaponin sich wie die vorher abgehandelten Saponine dem Blut gegenüber verhält.

Gesamtergebnis.

Durch Versuche mit neun verschiedenen Saponinen, die mit sechs verschiedenen Blutsorten, sowie z. T. auch gesondert mit Blutserum und mit Blutkörperchen gemischt wurden, konnte ich dartun, daß beim Koagulieren der Gemische sowohl auf heißem als auf kaltem Wege eine feste Bindung dieser Stoffe an das Blut stattfindet. In die Preßflüssigkeit gehen daher die geprüften Saponine, obwohl sie fast alle in Wasser leicht löslich sind, bei den angewandten Dosen nicht über. Auch mit Alkohol lassen sie sich dem Blutkuchen meist nicht oder nur spurweis entziehen. Kocht man jetzt den wasserfreien Kuchen mit Äther mehrmals aus, so entzieht man ihm sowohl das freie Cholesterin als auch das vorher an Saponin gebundene. Jetzt müßten die Saponine, wenn sie nur an Cholesterin gebunden gewesen wären, frei sein und durch neutrale, ja durch schwach saure Kochsalzlösung extrahiert werden können. Diese Voraussetzung erwies sich aber als irrig; die Saponine gingen so gut wie nie in den sauren Auszug über, wohl aber meist in den alkalischen. Sie müssen sich also im Kuchen in einer Bindung befinden, die erst durch Alkali aufgehoben wird. Sie verhalten sich also gerade umgekehrt wie die Agglutinine, die erst durch freie Salzsäure ausziehbar gemacht werden können.

Für das Sapindussaponin versagte die oben besprochene Isolierungsmethode manchmal. Ich wandte dann eine zweite noch praktischere und für alle Fälle passende an, indem ich den Preßkuchen wiederholt mit Methylalkohol auskochte und dem Verdunstungsrückstand dieses Auszuges sein Cholesterin durch heißen Äther entzog. Nach dem Trocknen gibt dann der Blutkuchen sein Saponin ohne weiteres an alkalische Kochsalzlösung ab.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geh. Medizinalrat Professor Dr. Kobert, spreche ich auch an dieser Stelle für seine liebenswürdigste Anregung und Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank aus.

Lebenslauf.

Unterzeichneter wurde geboren am 29. Mai 1890 zu Kaldenkirchen (Rhld.) als Sohn der Eheleute Kaufmann Gerhard Baltes und Josephine, geb. Goertz. Konfession: katholisch. Er besuchte 4 Jahre die Rektoratschule seiner Heimat, 1 Jahr die Obertertia zu Dorsten in Westf., weitere 4 Jahre das Kgl. Gymnasium zu Kempen (Rhein), woselbst er Ostern 1909 das Abiturientenexamen bestand. Um Medizin zu studieren, bezog er im ersten Semester Bonn, wo er gleichzeitig beim 9. Rhein. Infant.-Reg. Nr. 160 das erste Halbjahr als Einj.-Freiw. diente. Er hörte dort die Professoren Strasburger und Rumpf. Im zweiten Semester zog er nach Greifswald und hörte dort Vorlesungen der Professoren Kallius, Peter, Semrau, Auwers, Mie, Mandel, Müller. Auch in den folgenden 3 Semestern studierte er zu Greifswald. Im Sommer-Semester 1911 waren seine Lehrer die Professoren Kallius, Mie, Auwers, Müller und Semrau, im folgenden außer den genannten Herren die Professoren Bleibtreu, Mangold, Schütt und Starke. Im Physikumsemester belegte er bei den Professoren Kallius, Bleibtreu, Mangold, Strecker und Auwers. Ende Juli 1911 bestand er zu Greifswald die Vorprüfung mit „gut“. In den beiden ersten klinischen Semestern weilte er in Leipzig, wo er folgende Professoren und Dozenten hörte: Marchand, Rolly, v. Strümpell, Läwen, Döllken, Flechsig, Sudhoff, Stadler, Heller, Payr, Böhm, Lichtenstein, Zweifel, Skutsch und Franz Hofmann. Besonderes Interesse wandte er dort dem Studium der Psychiatrie zu. Im Winter-Semester 1912/13 und Sommer-Semester 1913 studierte er in Rostock als Schüler der Dozenten und Professoren Bennecke, Meinertz, Kobert, Martius, Schu-

chardt, Müller, Sarwey, Wolters, Brüning, Schwalbe, Körner, Peters und Grünberg. Vom 1. August 1913 bis 15. April 1914 unterbrach er die akademischen Studien, um bereits als Student vorwiegend die hautärztliche Praxis kennen zu lernen. Das letzte klinische Semester weilte er wieder zu Greifswald, wo er Vorlesungen hörte bei den Professoren: Kallius, Schulz, Grawitz, Römer, Kroemer, Löhlein und Adloff. Am 2. Mobilmachungstage wurde er als Feldunterarzt beim 4. Batl. des Kriegsbekleidungsamtes XVII. Armeekorps zu Langfuhr und am 1. Oktober als Assistenzarzt beim Hilfslazarett für Hautkranke, Danzig, außerdem eingestellt. Zur Ablegung der ärztlichen Notstaatsprüfung wurde er vom 20. bis 26. Sept. nach Greifswald beurlaubt; die Approbation als Arzt wurde ihm am 5. Oktober 1914 erteilt. Während dies gedruckt wird, ist er beschäftigt mittelst eines Lazarettzuges Verwundete aus Polen zu holen.

Danzig, Brotbänkengasse 15, 27. X. 1914.

Joseph Baltes, approb. Arzt.